



Etude du signal AMP cyclique déclenché par la chimiokine CX3CL1 en aval de son récepteur CX3CR1

Virginia Felouzis

► To cite this version:

Virginia Felouzis. Etude du signal AMP cyclique déclenché par la chimiokine CX3CL1 en aval de son récepteur CX3CR1. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066061 . tel-01147476

HAL Id: tel-01147476

<https://theses.hal.science/tel-01147476>

Submitted on 30 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE**

École doctorale Complexité du Vivant (ED515)

Spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée par

Mlle VIRGINIA FELOUZIS

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université PARIS VI

Sujet de thèse :

**Etude du signal AMP cyclique déclenché par la
chimioquine CX3CL1 en aval de son récepteur
CX3CR1**

Soutenue publiquement
le 31 mars 2015

Devant le jury composé de :

Pr. Pierre VINCENT
Dr. Karl BALABANIAN
Dr. Klaus SEUWEN
Dr. Gilles GUILLON
Dr Clotilde RANDRIAMAMPITA
Dr. DETERRE Philippe

Président
Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Table des Matières

Avant Propos	13
Introduction Bibliographique	17
I. LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G	21
A] GENERALITES	22
A.1 – STRUCTURES DES RCPG	23
A.2 – CLASSIFICATION DES RCPG	24
A.2.1 – La famille A : « Rhodopsin like »	25
A.2.2 – La famille B: « Secretin like »	27
A.2.3 – La famille C : « Metabotrope-glutamate/pheromone»	28
A.2.4 – Autres familles : D / E / F	28
B] TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LES PROTEINES G	29
B.1 – RCPG, L'HISTOIRE D'UNE CASCADE DE NOBEL	29
B.2 – LES DIFFERENTES PROTEINES G	30
B.3 – LE COUPLAGE DES PROTEINES G AUX RECEPTEURS	31
B.4 – ACTIVATION DES PROTEINES G	33
B.5 – LES EFFECTEURS DES PROTEINES G	33
B.5.1 – Les effecteurs activés par la sous-unité $G\alpha$	35
B.5.2 – Les effecteurs activés par le complexe $\beta\gamma$	38
C] REGULATION DE L'ACTIVITE DES RCPG	39
C.1– ELIMINATION DU LIGAND	39
C.2 – REGULATION PAR LES RGS (REGULATOR OF G PROTEIN SIGNALLING)	39
C.3 – DESENSIBILISATION	40
C.3.1 – Désensibilisation homologue	41
C.3.2 – Désensibilisation hétérologue	41
C.4 – INTERNALISATION DES RCPG DEPENDANTE DES B-ARRESTINES	42
C.4.1 – Internalisation constitutive des RCPG	42
C.4.2 – Internalisation dépendante du ligand	42
D] TRANSDUCTION DU SIGNAL NON-CONVENTIONNELLE	43
D.1– TRANSDUCTION DU SIGNAL DEPENDANT DES PROTEINES G PAR DES RCPG INTERNALISES	43
D.2– TRANSDUCTION DU SIGNAL INDEPENDANT DES PROTEINES G	46
D.2.1 – Activation des différentes voies MAPK	46
D.2.2 –Autres voies de signalisation	47

II. LE SYSTEME CHIMIOKINE/ RECEPTEUR DE CHIMIOKINE	49
A] LES CHIMIOKINES	49
A.1 – CLASSIFICATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE	50
A.1.1 – Les CXC-chimiokines	52
A.1.2 – Les CC-chimiokines	52
A.1.3 – Les CX3C-chimiokines	54
A.1.4 – Les C-chimiokines	54
A.2 – STRUCTURE DES CHIMIOKINES	54
A.2.1 – Séquence primaire	54
A.2.2 – Structure tridimensionnelle	55
A.2.3 – Structure quaternaire	55
A.2.4 – Fixation aux glycosaminoglycanes	57
B] LES RECEPTEURS AUX CHIMIOKINES (OU RCK)	58
B.1 – CLASSIFICATION DES RCK	58
B.2 – STRUCTURE DES RCK	59
B.3 – DIMERISATION ET OLIGOMERISATION DES RCK	60
B.4 – EXPRESSION DES RCK	61
B.4.1 – Profil d'expression des RCK	62
B.4.2 – Régulation de l'expression des RCK	62
C] INTERACTION CHIMIOKINE-RECEPTEUR	63
C.1 – REDONDANCE DES INTERACTIONS LIGANDS/RECEPTEURS	63
C.2 – UN MODELE D'INTERACTION EN DEUX ETAPES	64
C.3 – TRANSDUCTION DU SIGNAL	64
C.3.1 – Voies protéine G dépendantes	64
C.3.2 – Voies protéine G indépendantes	66
C.3.3 – Régulation de l'activité	67
D] ROLES PHYSIOLOGIQUES DES CHIMIOKINES ET DES RCK	68
D.1 – CHIMIOACTIVITE ET MIGRATION CELLULAIRE	69
D.1.1. – Transmigration endothéliale	69
D.1.2 – Migration interstitielle	70
D.2 – HEMATOPOÏESE	70
D.3 – ANGIOGENESE	71
D.4 – INITIATION DE LA REponse IMMUNITAIRE...	71
D.3.1 – ...innée	72
D.3.2 – ...adaptative	72
E] PHYSIOPATHOLOGIE DES CHIMIOKINES ET DE LEURS RECEPTEURS	73
E.1 – CHIMIOKINES ET MALADIES INFLAMMATOIRES	73
E.2 – CHIMIOKINES ET INFECTIONS VIRALES	75
E.3 – CHIMIOKINES ET CANCERS	75
E.3.1 – Rôle des chimiokines sur la croissance et/ou la survie tumorale	76
E.3.2 – Rôle des chimiokines sur l'angiogenèse tumorale	77
E.3.3 – Rôle des chimiokines dans la dissémination tumorale	78

III. LA CHIMIOKINE CX3CL1 ET SON RECEPTEUR LE CX3CR1	82
A] LA CHIMIOKINE CX3CL1, UNE CHIMIOKINE UN PEU PARTICULIERE...	82
A.1 – STRUCTURE	82
A.2 – RELATION STRUCTURE – FONCTIONS	83
A.2.1 – Domaine chimiokine	83
A.2.2 – Tronc mucine	84
A.2.3 – Domaine transmembranaire	84
A.2.4 – Domaine intracellulaire	84
A.3 – EXPRESSION DU CX3CL1	85
A.3.1 – Sites de production	85
A.3.2 – Régulation de l'expression	85
B] CX3CR1	87
B.1 – STRUCTURE	87
B.2 – POLYMORPHISME GENETIQUE DU CX3CR1	88
B.3 – EXPRESSION DU CX3CR1	89
B.3.1 – Les monocytes	89
B.3.2 – Les lymphocytes	91
B.3.3 – Les autres cellules CX3CR1 ⁺	92
B.3.4 – Régulation de l'expression du CX3CR1	92
B.4 – TRANSDUCTION DU SIGNAL EN AVAL DU CX3CR1	93
B.4.1 – Signal Calcique	93
B.4.2 – La voie AMP cyclique	94
B.4.3 – Interaction entre les voies de transduction calcique et AMPc	95
B.4.4 – Voie des MAP-Kinases	95
C] FONCTIONS ASSOCIEES AUX COUPLES CX3CR1/CX3CL1	96
C.1 – CHIMIOTACTISME	97
C.2 – ADHESION CELLULAIRE ...	97
C.2.1 – ... induite par la forme soluble	99
C.2.2 – ... induite par la forme membranaire	99
C.2.3 – Corrélations fonctionnelles du polymorphisme génétique du CX3CR1	100
D] PHYSIOLOGIE DU COUPLE CX3CR1/CX3CL1	101
D.1 – PROLIFERATION, DIFFERENTIATION ET SURVIE DES CELLULES	101
D.2 – OSTEOCLASTOGENESE	101
D.3 – REPONSES INFLAMMATOIRE ET IMMUNITAIRE	103
D.4 – ROLE PHYSIOLOGIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	104
CX3CL1, « SIGNAL OFF » DE L'ACTIVATION MICROGLIALE	104
E] PHYSIOPATHOLOGIE DU COUPLE CX3CR1/CX3CL1	105
E.1 – INFLAMMATION	105
E.2 – PATHOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE SUR FOND D'INFLAMMATION	106
E.3 – PATHOLOGIES CEREBRALES	108
E.3.1 – Douleur	108

E.3.2 –Maladies neurodégénératives	109
E.4- CX3CL1 ET CANCER	110
E.5- CX3CL1 ET VIH	112

IV. AMP CYCLIQUE & IMMUNITE : AMI OU ENNEMI ? **115**

A] ANATOMIE DU SYSTEME AMP_c **115**

A.1- EFFECTEURS ET VOIES DE SIGNALISATION	115
A.1.1 – Les Phosphodiesterases (PDE)	116
A.1.2 – Effecteurs de l'AMP _c	118
A.2- COMPARTIMENTATION DU SIGNAL CAMP...	121
A.2.1 – Importance des AKAP	122
A.2.2 – Implication des PDE	123

B] AMP_c ET FONCTIONS IMMUNITAIRES **124**

B.1 - AMP _c , ADHESION ET MIGRATION DES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE.	124
B.2 - AMP _c ET FONCTIONS IMMUNES ASSOCIEES AU MONOCYTE/MACROPHAGE	125
B.3 – AMP _c ET FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES	126
B.3.1 – Lymphocytes T	126
B.3.2 - Signal AMP _c , Lymphocyte et VIH	126
Exemple de l'implication de l'AMP _c dans la physiopathologie	126
B.3.3 – Lymphocytes B	128

C] OUTILS TECHNOLOGIQUES PERMETTANT L'ETUDE DU SIGNAL AMP_c **128**

C.1 – TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'AMP _c INTRACELLULAIRE	129
C.2 – TECHNIQUES RESOLUTIVES UTILISANT LE FRET OU LA LUMINESCENCE	130
C.2.1 - Techniques basées sur la PKA ou ses cibles	130
C.2.2 – Techniques résolutives basées sur les cibles de l'AMP _c	132
C.2.3 – Sondes basées sur EPAC	132

V. OBJECTIF DE LA THESE **136**

Article **133**

Résultats Complémentaires **139**

I. CARACTERISATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION AMP_c EN AVAL DU CX3CR1 (COMPLEMENTS) **187**

A] ETUDE DE L'IMPLICATION DE DIFFERENTS PARTENAIRES DE LA VOIE AMP_c DANS LA REPONSE INHIBITRICE INDUITE PAR LES CHIMIOKINES **187**

B] RECRUTEMENT DIFFERENTIEL DES B-ARRESTINES EN FONCTION DE L'ACTIVATION DU RECEPTEUR PAR LA FORME SOLUBLE OU LA FORME MEMBRANAIRE DU CX3CL1	195
 II. IMPLICATION DE L'AMP_c DANS LES FONCTIONS ASSOCIEES AU COUPLE CX3CL1/CX3CR1	 198
A] CHIMIOTACTISME ET AMP_c	199
B] EFFET DE L'AUGMENTATION D'AMP_c INTRACELLULAIRE SUR LA FONCTION ADHESIVE DU COUPLE CX3CR1/CX3CL1	200
C] AMP_c ET SURVIE	201
 Annexes – Fiches Techniques	 167
Références Bibliographiques	181

Liste des figures et tableaux

Figures :

- I-1 : Principe de transduction en aval des RCPG
- I-2 : Représentation schématique 3D et 2D de la structure générale des RCPG
- I-3 : Classification des RCPG
- I-4 : Les RCPG, une histoire de NOBEL
- I-5 : Cycle d'activation/désactivation des protéines G
- I-6 : Diversité des voies de signalisation en aval d'un RCPG
- I-7 : Structure de l'Adenylate Cyclase
- I-8 : Modèle « classique » de l'internalisation β -arrestine dépendante des RCPG
- I-9 : Résultats principaux issus de différentes études sur la transduction du signal AMPc par des récepteurs internalisés.

- II-1 : Implication du système chimiokinergique dans différents processus physiologiques et physiopathologiques.
- II-2 : Structure protéique des 4 sous familles des chimiokines humaines
- II-3 : Structure 3D des chimiokines
- II-4 : Interaction des chimiokines avec les GAG et leurs récepteurs.
- II-5 : Expression des chimiokines et de leurs récepteurs au sein des différents organes
- II-6 : Interaction en deux étapes des chimiokines avec leur récepteur
- II-7 : Complexité des voies de signalisation induite suite à l'activation d'un RCK
- II-8 : Rôle des chimiokines au cours de différents processus physiologiques

- III-1 : Structures schématiques des deux formes physiologiques du CX3CL1
- III-2 : Représentation schématique des variants génétiques du CX3CR1
- III-3 : Représentation schématique des deux principales sous-populations de monocytes chez l'humain et la souris
- III-4 : Représentation des principales voies de signalisation connues induites en aval du CX3CR1
- III-5 : Coordination de l'action de la chimiokine soluble et membranaire lors du processus de recrutement leucocytaire
- III-6 : Trois configurations d'adhérence cellulaire induite par le système intégrine et ou le couple CX3CR1/CX3CL1 sur des cellules endothéliales
- III-7 : Principaux rôles physiologiques de l'axe CX3CL1/CX3CR1
- III-8 : Boucle paracrine
- III-9 : Implication de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans différentes pathologies

- IV-1 : Représentation schématique de la Protéine Kinase A
- IV-2 : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines EPAC
- IV-3 : Modèle structural et mode de fonctionnement des canaux régulés par les nucléotides cycliques
- IV-4 : Localisation sub-cellulaire de quelques complexes AKAP-effecteurs au sein d'une cellule
- IV-5 : Principe du FRET
- IV-6 : Outils dynamiques de la mesure de l'AMPc cellulaire

Tableau :

- I.1 : Diversité et fonctions des différentes sous-unités des protéines G
- 1.2 : Diversité et régulation des AC
- II.1 : Classification des chimiokines et de leurs récepteurs
- II.2 : Homo et Hétéro-dimères de RCK
- II.3 : Exemples d'études précliniques « Cancer et Chimiokine »
- III.1 : Expression du CX3CL1 selon le tissu et le type de cellule
- III.2 : impact du polymorphisme de CX3CR1 dans différentes pathologies
- IV.1 : Classification des PDE
- IV.2 : Classification des outils permettant l'étude de l'AMPc intracellulaire

Liste des abréviations

A

aa -- > acides aminés
AC → Adenylate Cyclase
AMPc → Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-2 → Adaptator Protein complex 2
AKAP → A- Kinase Anchoring Protein
AKAR → A-Kinase Activity Reporter
ATP → Adénosine TriPhosphate

B

BRET → Bioluminescence Resonance Energy Transfer

C

CaMK → CalModuline- Kinase
CFP → Cyan Fluorescent Protein
CML → Cellules Musculaires Lisses
CNG → Cyclic Nucleotid Gated channel
CPA → Cellules Présentatrices de l'Antigène
CREB → C-AMP Response Element-Binding protein
CTX → ToXine Cholérique

D

DAG → Di Acyl Glycerol
DC → Dendritic Cell - Cellules Dendritiques
DMLA → Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DRY motif (E/DRY) → Aspartate / Arginine / Tyrosine

E

ECL → ExtraCellular Loop – Boucle ExtraCellulaire
EPAC → Exchange Protein directly Activated by cAMP
ELR-motif → Glutamate / Leucine / Arginine
ERK → Extracellular signal Regulated Kinase

F

FRET → Fluorescence Resonance Energy Transfer

G

GAG → GlycosAminoGlycane
GAP → GTPase Activating Protein
GDP / GTP → Guanosine Di- / TriPhosphate
GEF → Guanine nucleotide Exchange Factor
GIRK → G protein-coupled Inwardly-Rectifying K⁺ current
GMPc → Guanine Mono-Phosphate cyclique
GRK → G-protein coupled Receptor Kinase

H

HCN → Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated
HEK → Human Embryonic Kidney
HUVEC → Human Umbilical Vein Endothelial Cell

I

ICL → IntraCellular Loop – Boucle IntraCellulaire
IFN → InterFeroN
IκB →
IL → InterLeukine
IP3 → Inositol 1'-4'-5' triphosphate

J

JaK → Janus Kinase
JNK → c-Jun N-Terminal Kinase

L

LDL → Low Density Lipoprotein
LPA → LysoPhosphatidic Acid
LPS → LipoPolySaccharide

M

MAPK → Mitogen Activating Protein Kinase
MEK → MAP Kinase / Erk Kinase Kinase
MRP → Multidrug Resistant Protein

FSH/ FSHR→ Follicle-**S**timulating Hormone–

Hormone Folliculo **S**timulante/ **FSH Receptor**

FSK → For**S**Koline

N

NK→ Natural **K**iller

NFAT → Nuclear **F**actor of **A**ctivated **T**-cells

NF-κB → Nuclear **F**actor-**κB**

P

PDE → Phospho**D**i**E**sterase

PI3K → Phospho**I**nositide **3** **K**inase

PIP2 →Phosphat**I**dylinositol diphosphate

PI → Phospho**I**nositol

PKA / PKB / PKC → Protéine **K**inase **A / B / C**

PKI → Protéine **K**inase Inhibitor

PLC / PLA2→ Phospho**L**ipase **C / PhosphoLipase A2**

R

RCPG → Récepteurs **C**ouplés aux **P**rotéines **G**

RCK → Récepteur aux **C**himio**K**ines

RGS → **R**egulator of **G** protein **S**ignalling

RIA → Radi**I**mmuno**A**ssay

ROS → **R**eactive **O**xygen **S**pecies

S

Src→ Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

STAT → **S**ignal Transducers and **A**ctivators of Transcription

T

TCR→ **T**-Cell **R**eceptor

TSH/ TSHR→ Thyroïd **S**timulating **H**ormone / **TSH Receptor**

TNF → Tumor **N**ecrosis **F**actor

TGF → Tumor **G**rowth **F**actor

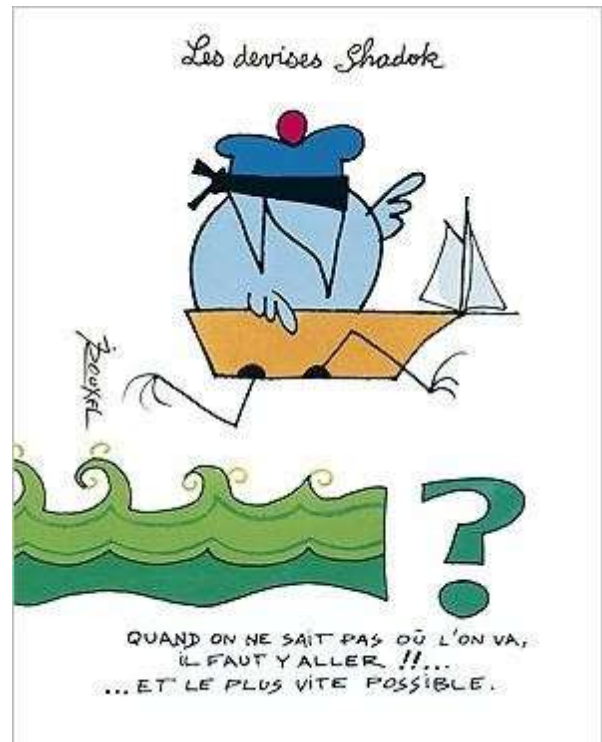
V

VEGF→ **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor

VIH→ **V**irus d'Immunodéficience **H**umaine

Y

YFP→ **Y**elow **F**luorescent **P**rotein



AVANT PROPOS

De nombreuses fonctions vitales aussi diverses que le développement embryonnaire, la plasticité cérébrale ou le fonctionnement du système immunitaire, dépendent de processus de migration et de recrutement cellulaire. Ces fonctions sont assurées, entre autres, par la famille des chimiokines ou cytokines chimiotactiques. On en connaît aujourd'hui plus d'une cinquantaine. Il s'agit de petites protéines sécrétées d'une centaine d'acides aminés, de poids moléculaire compris entre 8 et 14 kDa. De manière générale, elles interviennent dans le routage des cellules immunes et prennent à ce titre une part décisive dans la mise en place et la régulation de la réponse immune. Cependant, les chimiokines interviennent également dans d'autres processus biologiques comme l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la dégranulation des leucocytes. De ce fait, elles sont également impliquées dans de nombreuses pathologies dont l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde ou encore dans certains cancers.

Toutes les chimiokines activent leurs cellules cibles via des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG), c'est-à-dire des protéines composées de 7 hélices α transmembranaires.

Le couple CX3CL1/CX3CR1 sur lequel porte ce travail de thèse se distingue des autres couples chimiokines/récepteurs par plusieurs aspects. L'une de ses particularités réside dans le fait que le CX3CL1 (ou fractalkine) est une chimiokine qui existe sous deux formes protéiques fonctionnelles : une forme soluble chimio-attractante comme toutes les chimiokines et une forme membranaire qui confère à ce couple des propriétés d'adhérence, contribuant notamment à l'arrêt de leucocytes circulants sur la paroi endothéliale et leur migration vers le foyer inflammatoire. Une autre des particularités de ce couple est l'existence de deux variants naturels du CX3CR1, annotés VT et IM, en fonction de la nature des acides aminés en position 246 et 280 (V246I/T280M). Le variant IM est associé à une progression plus rapide vers le SIDA en cas de contamination, à un moindre risque vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, à une susceptibilité moindre à certain astrocytome et à une augmentation du risque de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

Une meilleure connaissance de la signalisation en aval des récepteurs aux chimiokines et des éventuelles différences de signaux selon la forme activatrice du ligand ou selon le variant du récepteur, permettrait de progresser dans la définition de moyens d'intervention pharmacologiques afin de lutter contre les multiples pathologies dans lesquelles ce couple chimiokine/récepteur et, plus généralement, dans lesquelles les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués.

Les devises Shadok

JE DIS DES CHOSES
TELLEMENT
INTELLIGENTES
QUE, LE PLUS
SOUVENT, JE
COMPRENDS PAS
CE QUE
JE DIS.

Joe
Laby
Zomeur



Reyrol

INTRODUCTION

I. Les récepteurs couplés aux protéines G

La capacité des organismes multicellulaires, qu'ils soient animaux ou végétaux, à réagir aux signaux provenant de leur environnement est déterminante pour leur survie et leur développement. Cette nécessité d'adaptation, essentielle au maintien de l'équilibre de l'organisme, apparaît dès l'échelle cellulaire à travers un processus de communication finement « orchestré » avec le milieu environnant. La communication cellulaire peut être définie comme l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule de recevoir, d'intégrer et de répondre aux signaux émis par son environnement. Cet ensemble de mécanismes (*réception, transduction des messages et génération d'une réponse cellulaire appropriée*) nécessite la présence de protéines membranaires capables de capter, décoder et relayer les différents stimuli du milieu extracellulaire en signaux intracellulaires. Ce processus implique l'activation coordonnée de différents effecteurs tels que des enzymes, des canaux ioniques ou des facteurs de transcription. Ces réactions moléculaires en cascade constitue le processus de transduction du signal, à l'origine du déclenchement d'une réponse biologique de la cellule cible (*migration, sécrétion, mitose, expression génique, ...*).

Les récepteurs membranaires représentent donc l'interface entre un stimulus extracellulaire et sa perpétuation dans le cytosol. Ces récepteurs appartiennent à plusieurs classes de protéines, que l'on peut différencier selon leur mode d'action et leur structure moléculaire. On distingue notamment les récepteurs de type canaux ioniques (récepteurs ionotropiques) et les récepteurs associés à une activité enzymatique (récepteurs métabotropiques). Les récepteurs métabotropiques sont eux-mêmes subdivisés en deux grandes classes de récepteurs selon le type d'enzyme associée, les récepteurs associés à une activité tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons spécifiquement aux RCPG, aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires.

A] Généralités

Les RCPG sont certainement parmi les plus anciens transducteurs de signaux. En effet, ils sont présents chez les plantes, les levures, les champignons, ainsi que les protozoaires et les métazoaires diploblastiques. Ils interviennent dans tous les grands systèmes de communication intercellulaire. Par comparaison les récepteurs à tyrosine kinase n'apparaissent qu'avec les métazoaires triploblastiques. Chez l'homme, il existe plus de 1000 RCPG différents, dont plus de la moitié, sont des récepteurs olfactifs (Bockaert and Pin 1999) (Fredriksson and Schioth 2005). 3% du génome humain est consacré à cette famille de protéine. Cela fait de la famille des RCPG, une des plus grandes classes de protéines du génome humain.

Les ligands des RCPG sont d'une très grande diversité chimique. Ils incluent des photons, des ions (Ca^{2+}), des stimuli sensoriels (*molécules olfactives, gustatives et phéromones*), des petites molécules endogènes (*acides aminés, amines, nucléotides, lipides et peptides endogènes*), des composés exogènes (*cannabinoïdes, peptides d'amphibiens: ranatensine ou bombésine*), des composés impliqués dans les réactions du système immunitaire (*chimiokines, anaphylatoxines C3a et C5a du complément, peptides N formylés chimiotactiques*) et des protéines (*hormones glycoprotéiques, protéases*) (Vassilatis, Hohmann et al. 2003).

Le signal apporté par le stimulus extracellulaire est transmis à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire du récepteur qui la plus part du temps active une protéine hétérotrimérique, liant les nucléotides guanyliques di- ou triphosphate (GDP/GTP), aussi appelée protéine G, d'où l'appellation récepteurs couplés aux protéines G. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant l'amplification du signal et la genèse d'une réponse cellulaire appropriée (Figure I-1).

Les premiers RCPG ont été décrits comme des récepteurs capables de moduler l'activité d'une enzyme membranaire, l'adénylyl cyclase (AC), via l'activation des protéines G (Rodbell 1992). Mais au fil du temps, il est apparu que les RCPG régulent d'autres effecteurs tels que des canaux ioniques ou encore des kinases. De plus, il est maintenant clair que les RCPG interagissent de façon directe ou indirecte avec un nombre important de protéines régulatrices ou des protéines d'échafaudage créant ainsi une plateforme fonctionnelle de signalisation qualifiée de «réceptosome » (Bockaert, Roussignol et al. 2004). Enfin les RCPG ne sont plus considérés comme des entités monomériques depuis la mise en évidence de dimères (homo- ou hétérodimères) de RCPG, même si l'existence de ces dimères semble transitoire (Mizoue,

Bazan et al. 1999; Garton, Gough et al. 2001; Prinster, Hague et al. 2005; Kasai and Kusumi 2014).

Aussi, au vu de la multitude de signaux qu'ils transmettent et, de ce fait, du grand nombre de processus physiologiques qu'ils contrôlent (*modulations cardio-vasculaires, neurotransmission, régulations hormonales, réponses immunitaire et inflammatoire, douleur,...*) la compréhension du mode de fonctionnement et de régulation des RCPG est capitale, plus particulièrement dans le domaine pharmaceutique. A l'heure actuelle on estime que plus de 60% des médicaments utilisés ont pour cible un antagoniste de la voie de transduction via les RCPG (Bockaert and Pin 1999; Fong, Alam et al. 2002).

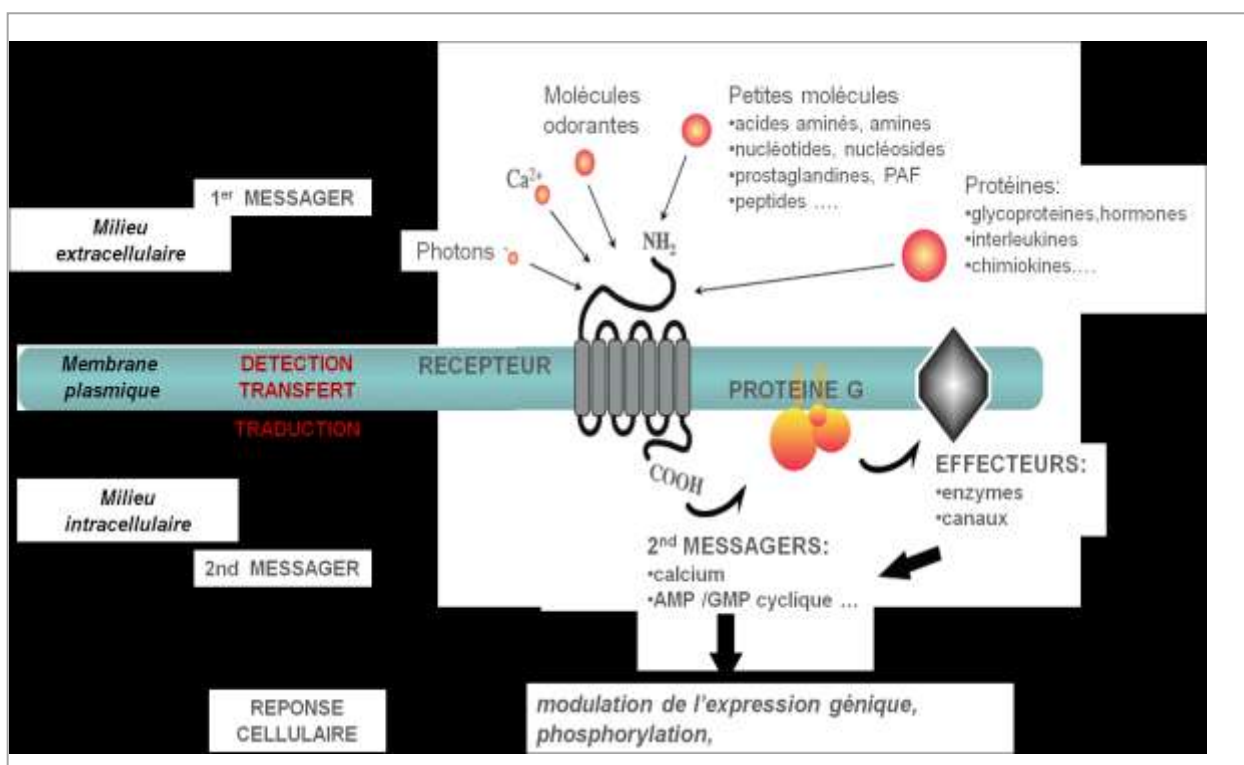


Figure I-1 : Principe de la transduction du signal en aval des Récepteurs Couplés aux Protéines G.

Les RCPG sont capables de reconnaître des ligands extrêmement variés (photons, ions, molécules odorantes, peptides, lipides, protéines...). La liaison de molécules messages sur la face extracellulaire du récepteur permet l'activation au niveau intracellulaire de protéines G. Les protéines G, une fois activées, agissent à leur tour sur différents effecteurs responsables d'effets intracellulaires importants parmi lesquels la prolifération ou encore la survie cellulaire.

A.1 – Structures des RCPG

Jusqu'en Octobre 2007, la rhodopsine bovine était le seul récepteur de la famille des RCPG dont la structure cristallographique était résolue. De ce fait elle a longtemps été utilisée comme modèle des RCPG.

A l'heure actuelle, plus d'une dizaine de structures cristallographiques de RCPG ont été obtenues (Ozaki, Shibasaki et al. 2000; Cullere, Shaw et al. 2005), dont celle des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ -adrénergique, du récepteur A2 de l'adénosine (Warne, Serrano-Vega et al. 2008) (Jaakola, Griffith et al. 2008) ou encore celle du CXCR1 (Geissmann, Jung et al. 2003). La comparaison des séquences de ces RCPG révèle une topologie membranaire commune à tous les membres de cette superfamille : sept segments hydrophobes transmembranaires organisés en hélice α , particulièrement bien conservés et composés chacun d'environ 25 à 35 acides aminés (aa) organisés en un tonnelet tridimensionnel (**Figure I-2**). Ces segments transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles cytoplasmiques (ICL) et trois boucles extracellulaires (ECL). Les extrémités N-terminale et C-terminale se situent respectivement du côté extracellulaire et intracellulaire. L'extrémité N-terminale constitue la région la plus variable, pouvant être constituée de 7 aa comme dans le cas du récepteur A2 de l'adénosine comme de 5900 aa dans le cas du VLGR (**V**ery **L**arge **G**-protein coupled **R**eceptor). Ces variations de taille importantes dans la longueur des extrémités N-terminale et des boucles constituent un des critères permettant de caractériser les différentes familles de RCPG.

A.2 – Classification des RCPG

De nombreux systèmes de classification des RCPG ont été proposés. Ils répartissent les récepteurs en sous-groupes ou familles en se basant sur des critères variés tels que le mode de liaison du ligand, la structure, la phylogénie ou encore la composition en aa (Kumari, Pant et al. 2009).

La classification la plus répandue est celle établie par Kolakowski en 1994, qui identifie six classes, basée sur la recherche de similarité entre RCPG connus de vertébrés ou d'invertébrés (Kolakowski 1994). Cette classification servira de base par la suite à la création de la base de données des RCPG, appelée GPCRdb (pour **G**-Protein **C**oupled **R**eceptors **d**atabase). Une autre classification, proposée par Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin, répertorie les RCPG en cinq classes sur la base de critères structuraux et selon le mode de liaison du ligand (Bockaert and Pin 1999). Parallèlement, deux études proposent des classifications phylogénétiques des RCPG (Joost and Methner 2002; Fredriksson and Schioth 2005).

Dans ce chapitre nous ne détaillerons que la classification de Kolakowski, du fait de son utilisation prédominante. Celle-ci attribue une lettre à chaque famille de RCPG : A pour Rhodopsin-like, B pour Secretin-like, C pour Metabotrope-glutamate/phéromone, D pour fungal pheromone, E pour AMP cyclique et enfin F pour Frizzled/smoothened.

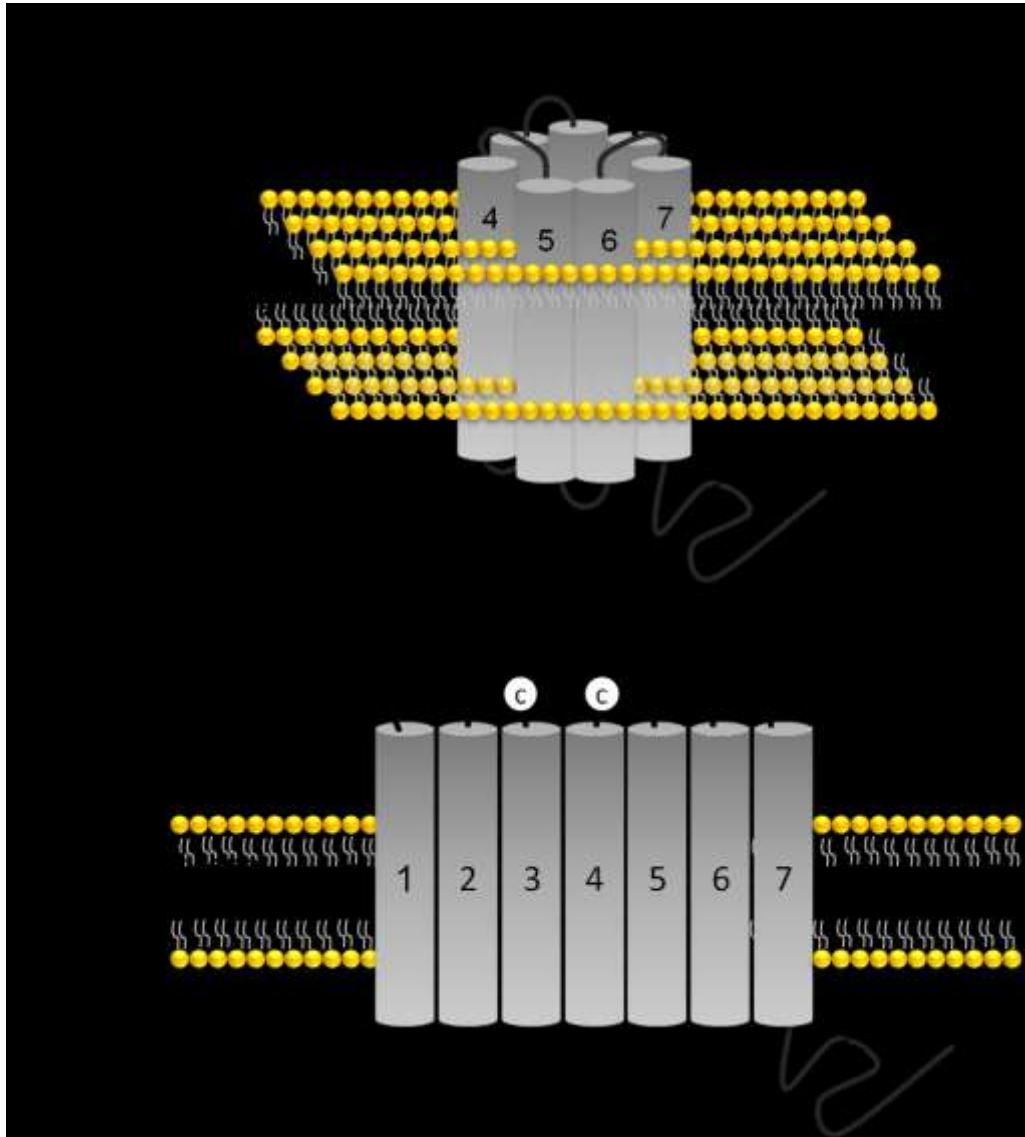


Figure I-2 : Représentation schématique 3D et 2D de la structure générale des récepteurs couplés aux protéines

Les 7 segments transmembranaires antiparallèles hydrophobes (1-7), qui caractérisent les RCPG, sont reliés par 3 boucles intracellulaires (ICL1-3) et 3 boucles extracellulaires (ECL1-3). L'extrémité N-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité C-terminale est intracellulaire.

A.2.1 – La famille A : « Rhodopsin like »

La famille A est la mieux caractérisée et aussi celle qui comporte le plus grand nombre de récepteurs avec plus de 80% des RCPG dont la rhodopsine et le récepteur $\beta 2$ -adrénergique. Cette classe de récepteurs lie des hormones, des polypeptides, des amines biogènes, des photons ou encore des substances apparentées aux lipides. La moitié des récepteurs de cette famille sont décrits comme des récepteurs sensoriels impliqués dans la reconnaissance de stimuli olfactifs, gustatifs ou lumineux. Cette classe est divisée en trois sous-groupes suivant la taille et l'emplacement du site de liaison du ligand (Figure I-3) :

- la sous classe A1 comprend des récepteurs dont les ligands sont de petites molécules comme le rétinol et pour lesquels le site de liaison est constitué par une cavité formée par les segments transmembranaires au sein du tonnelet central du RCPG

- la sous-classe A2 comprend des récepteurs dont le site de liaison implique l'extrémité N-terminale, les boucles extracellulaires et la partie supérieure des domaines extracellulaires. Les récepteurs de chimiokines font partie de cette sous-famille

- la sous-classe A3 comprend des récepteurs d'hormones glycoprotéiques (*Thyréostimuline*-TSH, *Hormone folliculo-stimulante*-FSH ou *Hormone lutéinisant*-LH). Elle est caractérisée par un grand domaine N-terminal qui sert de site de liaison du ligand.

Ce groupe est caractérisé par 3 grandes signatures :

- un motif E/DRY (glutamate /aspartate-arginine-tyrosine) à l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaire 3 (TM3).
- deux cystéines qui forment un pont disulfure sur les deux premières boucles ECL1 et ECL2, permettant le maintien de la structure tertiaire de la molécule
- et le motif NPXXY (asparagine-proline-X-X-tyrosine) dans le domaine transmembranaire 7 (TM7) qui induit une torsion de l'hélice et qui semble être importante pour l'activation des récepteurs (He, Browning et al. 2001)

On note également la présence d'un aa di-acide (*aspartate ou glutamate*) très conservé dans le TM2 dont le rôle serait la reconnaissance du ligand et le couplage à la protéine G (Ceresa and Limbird 1994). L'extrémité C-terminale possède un site de palmitoylation. Ce site de modification post-traductionnelle représente un ancrage lipidique dans la membrane, pouvant, ainsi créer une quatrième boucle intracellulaire (ICL4).

Parmi ces séquences consensus, le motif E/DRY a fait l'objet d'une multitude d'études, notamment sur son implication dans l'activation des RCPG de la classe A (Rovati, Capra et al. 2007). Il a ainsi été montré que toute mutation dans ce motif affecte le couplage aux protéines G (Murphy 1994; Fourmy, Escrieut et al. 2002).

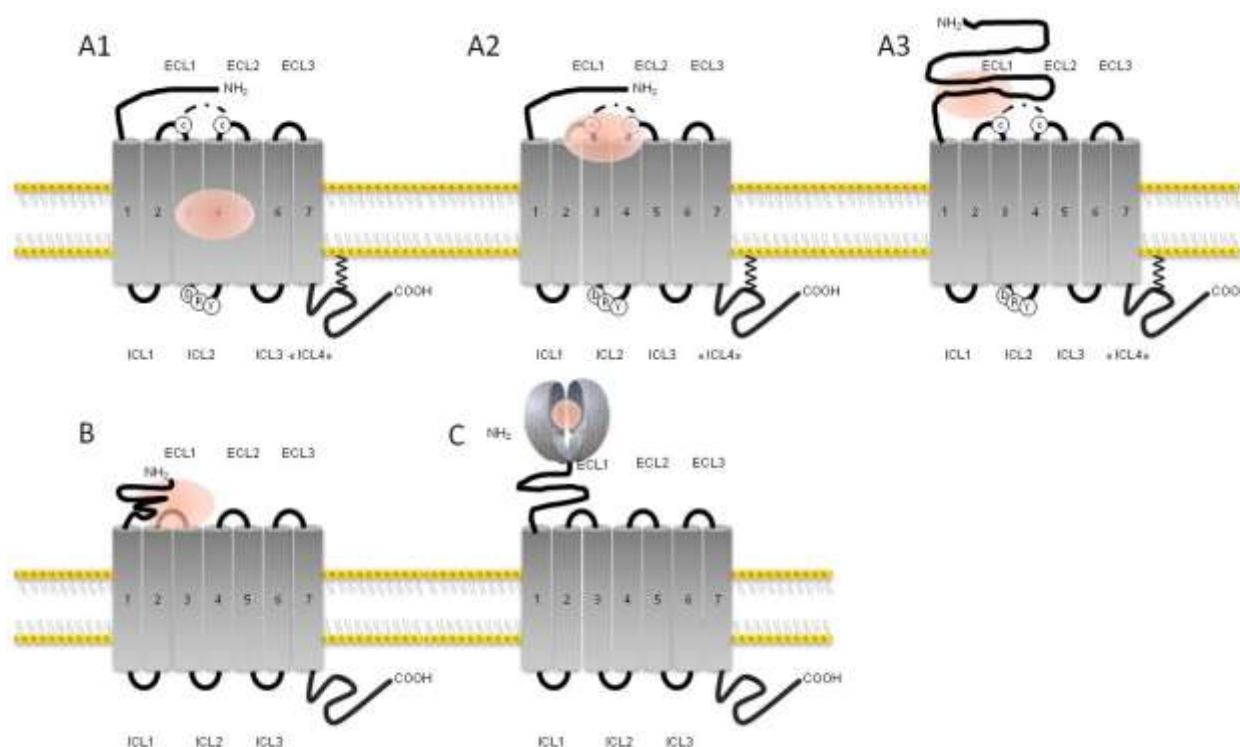


Figure I-3 : Classification des RCPG. Représentation schématique de la structure générale de certaines familles de RCPG et des interactions ligand (en rose).-récepteur

A.2.2 – La famille B: « Secretin like »

La classe B des RCPG ne présente qu'une faible homologie (12%) de séquence avec la classe A.

Cette famille de RCPG se lie avec des peptides relativement grands tels que des hormones et des neuropeptides. Cette famille regroupe des récepteurs structurellement proches du récepteur à la sécrétine. On y retrouve notamment le récepteur du glucagon, du GIP (**G**astric **I**nhibitory **P**olypeptide), du GLP-1R et GLP2-R (**G**lucagon **L**ike **P**eptide-1/2), le récepteur de la PTH (**H**ormone **P**ara**T**hyroïdienne), le récepteur à la calcitonin, le récepteur à la GHRH (**G**rowth **H**ormone **R**eleasing **H**ormone), les récepteurs au VIP (**V**asoactive **I**ntestinal **P**olypeptide) et du PACAP (**P**ituitary **A**denylate **C**yclase-**A**ctivating **P**olypeptide). Le site de liaison du ligand se situe au niveau de l'extrémité N-terminale du récepteur comme pour les récepteurs de la famille A3, bien qu'il n'existe pas d'identité de séquences entre les deux familles (Figure I-3).

A.2.3 – La famille C : « Metabotrope-glutamate/pheromone »

La famille C des RCPG regroupe les récepteurs metabotropiques du glutamate, les récepteurs au calcium, les récepteurs GABA-B, les récepteurs du goût, les RAIG (**R**etinoic **A**cid **I**nducible orphan **G**PCR) et les récepteurs aux phéromones.

Ces RCPG ont la particularité de présenter une extrémité N-terminale particulièrement longue d'environ 500 aa. Le repliement de l'extrémité N-terminale donne lieu à la formation de deux lobes qui constituent le site de liaison de l'agoniste. Il existe, pour cette classe de RCPG, de nombreux ligands allostériques capables de moduler l'activité des récepteurs en se liant à différent site du ligand, dit site orthostérique. Une autre particularité de la classe C réside dans la taille de la troisième boucle intracellulaire qui est très courte et très conservée (Pin, Galvez et al. 2003) (**Figure I-3**). Du point de vue de l'activation des récepteurs de la famille C, la dimérisation entre deux récepteurs identiques (homodimérisation) ou entre deux récepteurs différents (hétérodimérisation) est un élément crucial. Ceci a été particulièrement étudié dans le cas du récepteur au GABA (Pin, Galvez et al. 2003). Une seule molécule de l'agoniste suffit à activer le dimère de récepteur.

A.2.4 – Autres familles : D / E / F

La famille D est constituée de récepteurs de phéromones principalement exprimés chez les insectes (Nakagawa, Sakurai et al. 2005). Elle inclut également des récepteurs de phéromones de levures, tels que les récepteurs des facteurs α et a (STE2 et STE3) (Josefsson 1999).

La famille E est formée par les quatre récepteurs à l'AMPc (cAR 1–4) et d'autres récepteurs « cAMP receptor-like » caractérisés chez *Dictyostelium discoideum*. Ces récepteurs sont exprimés lors des étapes précoces du développement de cette amibe où ils participent au système de signal chimiotactique. Plus tard dans le développement, ils interviennent dans la différenciation cellulaire et dans le contrôle du cycle cellulaire (Prabhu and Eichinger 2006). A ce jour, aucun homologue n'a été trouvé chez les vertébrés, ce qui en fait une famille de RCPG minoritaire, mais unique.

La famille F de récepteurs rassemble des récepteurs homologues aux protéines « frizzled » et « smoothened ». Les récepteurs de type « frizzled » jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et plus particulièrement dans le contrôle de la prolifération et la

polarité cellulaire, en se liant avec Wnt et en activant le signal Hedgehog. Ils sont également impliqués dans les processus de différenciation cellulaire et d'apoptose (Wang, Liu et al. 2006). Chez les mammifères, dix récepteurs “frizzled” et un récepteur « smoothened » ont été identifiés. Leurs boucles intracellulaires sont parmi les plus courtes des RCPG et la longueur de la partie C-terminale varie d'une vingtaine à plus de 200 aa chez l'Homme. Ces récepteurs présentent une homologie de séquence faible mais significative avec la famille B (Malbon 2004).

B] Transduction du signal par les protéines G

Hormis des éléments structuraux communs, l'autre caractéristique à tous les RCPG tient du fait qu'ils déclenchent une cascade de signalisation par le biais des protéines G hétérotrimériques avec lesquelles ils interagissent. Le récepteur activé par la liaison de son ligand subit des changements conformationnels qui par extension favorisent son interaction avec la protéine G, ce qui catalysera l'activation de cette dernière. La protéine G ainsi activée peut alors induire la transmission du signal intracellulaire.

Parallèlement à cette transduction du signal protéine G dépendante ; d'autres signaux en aval des RCPG semblent totalement indépendant de l'activation de la protéine G (Heuss and Gerber 2000). Par ailleurs, et contrairement au modèle proposé au moment de leur découverte, un RCPG donné n'active pas une seule voie de signalisation spécifique. En effet, un même RCPG peut activer plusieurs voies de signalisation en parallèle. La nature et l'importance de ces voies transductionnelles activées varient d'un type cellulaire à l'autre. La signalisation des RCPG apparaît donc comme riche et variée, d'où une difficulté à établir des modèles généraux, tous les mécanismes de cette transduction n'étant pas encore connus.

B.1 – RCPG, l'histoire d'une cascade de Nobel

C'est dans les années 70' que les premiers acteurs de la cascade de signalisation en aval des RCPG sont découverts. L'adénosine-3'-5'-monophosphate cyclique (AMPc) et l'enzyme responsable de sa synthèse l'adénylate cyclase (AC) sont les premiers partenaires à être mis en lumière. Cette découverte vaudra à Earl W Sutherland le prix Nobel de médecine en 1971 (Robison and Sutherland 1971). Parallèlement à ces travaux, Edwin G. Krebs découvre la protéine kinase activée par l'AMPc décrivant ainsi un niveau plus en aval dans la cascade de signalisation. Cette protéine, aujourd'hui connue sous le nom de Protéine Kinase A (PKA), est le premier effecteur de la voie de signalisation AMPc dépendante (Walsh, Perkins et al. 1968). C'est le second Nobel de médecine (1992) en rapport avec la signalisation AMPc. Il faut attendre la fin des années 70' et la démonstration d'Alfred G. Gilman et de M. Rodbell sur

l'existence d'une protéine intermédiaire faisant le lien entre le récepteur et l'AC, pour qu'un troisième acteur de la voie soit évoqué (Rodbell, Krans et al. 1971). En 1980, la protéine G_s est purifiée et sa structure hétérotrimérique est décrite (Northup, Sternweis et al. 1980). Cette dernière pièce du puzzle permet à Rodbell et Gilman de décrocher, en 1994, le troisième Nobel de Physiologie et Médecine attribué à cette thématique. Ces différents biochimistes ont été les pionniers de la recherche moderne sur la transduction du signal. Dans les années 80' les autres protéines G ont été découvertes et leur rôle d'hydrolyse du GTP (**G**uanosine **T**ri**P**hosphate) mis en évidence, connectant ainsi les récepteurs à l'AC. Récemment, en 2012, les travaux des américains Robert Lefkowitz et Brian Kobilka portant sur l'étude structurale et fonctionnelle du complexe ligand-RCPG-protéine G ont été récompensés par le Nobel de chimie 2012 (Figure I-4).

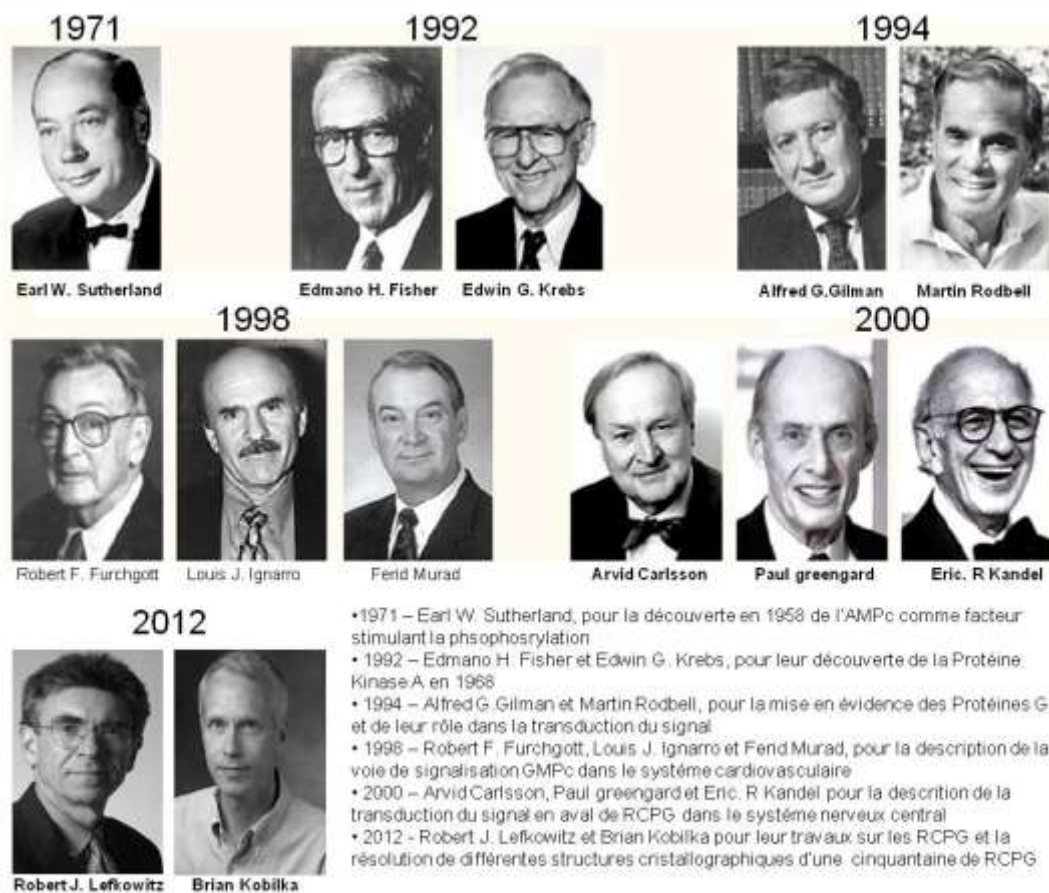


Figure I-4 : Les RCPG, une histoire de Nobel

B.2 – Les différentes protéines G

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques composées de sous-unités α , β et γ . Lorsque la protéine G est activée par le récepteur, elle se dissocie en deux parties indépendantes, la sous-unité α et le complexe $\beta\gamma$ qui interagissent par la suite avec des

protéines effectrices intracellulaires différentes, dont elles vont moduler la fonction afin d'engendrer une réponse cellulaire adaptée (Robishaw and Berlot 2004). L'existence de nombreuses sous-unités α , β et γ différentes a été rapportée. Le clonage par homologie a permis l'identification de 35 gènes codant les différentes sous-unités des protéines G (*16 codent les α , 5 les β et 14 les γ*) (Milligan and Kostenis 2006).

Les sous-unités α , malgré une grande diversité, présentent toutes une activité d'hydrolyse du GTP. Elles se subdivisent en quatre sous-groupes qui diffèrent autant par leur expression tissulaire que par leur action sur leurs effecteurs : α_s (4 sous-types, stimulatrice de l'AC), $\alpha_{i/o}$ (6 sous-types, inhibitrice de l'AC), $\alpha_{q/11}$ (5 sous-types, activant la PLC) et $\alpha_{12/13}$ (2 sous-types jouant un rôle dans la régulation du cytosquelette) (**Tableau 1.1**). Cinq sous-unités β et douze sous-unités γ sont décrites à ce jour. Les sous-unités β sont assez similaires entre elles d'un point de vue structural alors que les sous-unités γ présentent une variation plus importante.

Un degré de diversité supplémentaire provient de l'assemblage croisé de ces trois sous-unités α , β , γ entraînant ainsi une multitude de combinaisons possibles. Cette grande diversité de structure et d'assemblage contribue probablement à l'exceptionnelle variété des réponses biologiques associées aux RCPG.

B.3 – Le couplage des protéines G aux récepteurs

Les premières données conduisant à déterminer quelle protéine G est couplée à un RCPG donné, ont été obtenues au moyen d'expériences utilisant des toxines. Il a ainsi été rapporté que la protéine G_{α_s} est sensible à la toxine cholérique (CTX) qui la bloque dans un état actif suite à l'ADP-ribosylation d'un résidu arginine du site liant le nucléotide guanilylique (Gill and Meren 1978). Parallèlement la protéine G_{α_i} est inhibée par la toxine pertussique (PTX) qui, par ADP-ribosylation d'un résidu cystéine proche du site de liaison du récepteur, la bloque dans un état inactif (Bokoch and Gilman 1984) (**Tableau I.I**).

Actuellement, nous disposons de diverses techniques pour déterminer la spécificité de couplage des protéines G aux récepteurs, telles que la co-immunoprécipitation, la mutagénèse dirigée, le BRET (**B**ioluminescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) ou encore l'utilisation de modèles cellulaires ou animaux «knockout» pour certaines protéines ou sous-unités. Leurs utilisations font ressortir l'idée qu'un RCPG est capable d'interagir avec plusieurs types de protéine G (Hermans 2003). Un exemple de cette sélectivité multiple a été montré par le groupe de Hillhouse en 2001, avec le récepteur de la CRH (**C**orticotrophin **R**eleasing **H**ormon) capable

de se coupler à 5 protéines G différentes : G_s , $G_{q/11}$, G_o , et avec une efficacité réduite $G_{i1/2}$ et G_z (Grammatopoulos, Randeva et al. 2001).

Famille	Sous Type	Effecteur	Distribution	Toxine
$G\alpha_s$	$\alpha_{s(S),(L),(XL)}$ α_{olf}	↗ AC, ↗ Src tyrosine Kinase ↗ AC	Ubiquitaire Neurones olfactifs, tractus digestif et urogénital	CTX CTX
$G\alpha_{i/o}$	$\alpha_{o1/2}$	↘ AC, ↘ canaux Ca^{2+} , ↗ canaux K^+	Neurones, astrocytes, cœur	PTX
	$\alpha_{i1/2/3}$	↘ AC, ↘ canaux Ca^{2+} , ↗ canaux K^+ , ↗ Src tyrosine kinase, ↗ MAPK	Ubiquitaire	PTX
	α_z	↘ AC, ↘ canaux Ca^{2+} , ↗ canaux K^+ , ↗ Rap1GAP	Plaquettes, Neurones	?
	α_{t1-2}	↗ cGMP- Phosphodiesterase	Cônes, bâtonnets, bourgeons du goût	PTX
	α_{gust}	?	bourgeons du goût, chemorécepteurs des voies aériennes	PTX
$G\alpha_{q/11}$	$\alpha_{q/11}$	↗ PLC $\beta_{1/3}$	Ubiquitaire	YM-254890
	$\alpha_{14/15/16}$	↗ PLC $\beta_{1/3}$	Cellules hématopoïétiques	?
$G\alpha_{12/13}$	$\alpha_{12/13}$		Ubiquitaire	?
	β_1 à 5 γ_1 à 12	↗ PLC β , ↗ PLA $_2$, ↗ GIRK ↘ canaux Ca^{2+} , ↘ AC type I ↗ AC type II, IV, VII ↗ PI3Kinase, ↗ Src Kinase ↗ GRK, ↗ JNK	$\beta_1\gamma_1$: cônes $\beta_3\gamma_8$: bâtonnets β_5 : neurones $\beta_{5(L)}$: rétine autres $\beta\gamma$: ubiquitaires	

Tableau 1.1 : Diversité et fonctions des différentes sous-unités des protéines G.

Seuls les principaux effecteurs sont indiqués. Certaines sous-unités peuvent être ADP ribosylées par la toxine Pertussique (PTX) ou cholérique (CTX). (D'après Milligan et Kostenis, 2006).

AC (Adenylate Cyclase), GRK (kinase des RCPG), GIRK (canaux potassiques de la rectification entrante), PI3-kinase (phosphoinositide 3-kinase), PLA2 (Phospholipase A2), PLC (Phospholipase C) Ras-GEF (protéine d'échange GDP/GTP de la petite protéine G Ras), RhoGEF (protéine facteur d'échange GTP/GDP de la protéine Rho).

Cependant, tous les RCPG ne sont apparemment pas capables d'activer plus d'une classe de protéines G. En effet, on estime que seulement 11% des RCPG peuvent activer plusieurs types de protéines G avec une efficacité différente, les autres RCPG seraient spécifiques d'une seule classe de protéine G avec 43% couplés à $G_{i/o}$, 33% couplés à $G_{q/11}$ et 25% préférentiellement couplés à G_s (Wong 2003).

B.4 – Activation des protéines G

Bien que leurs effecteurs diffèrent et donc induisent des cascades de signalisation distinctes, les protéines G présentent un mécanisme commun d'activation et de désactivation (Figure I-5) :

En absence de ligand et à l'état basal, le récepteur oscille entre une conformation inactive, majoritaire (notée R) et une conformation active mais non liée au ligand (notée R*). C'est sous la seconde conformation R* que le récepteur lie la protéine G hétérotrimérique, où la sous unité α est liée au GDP. Lors de la fixation du ligand (L) au récepteur, cet équilibre R-R* est déplacé en faveur de la conformation active du récepteur (L-R**). Dans cette conformation active, le récepteur se lie à la protéine G et induit son changement conformationnel. Le récepteur activé agit comme catalyseur de l'ouverture du site GTPase de la sous unité α , ce qui aboutit à une réaction d'échange du GDP par du GTP. Ainsi selon la nomenclature établie pour les « petites G-protéines » de la superfamille Ras, le récepteur est une protéine de type GEF (Guanine Exchange Factor). Le processus moléculaire de l'échange se fait en deux étapes quasi simultanées, d'une part la libération du GDP lié à l'état basal à la sous-unité α , suivie de la liaison soit d'une nouvelle molécule de GDP ou de GTP. La liaison du GTP à la sous-unité α , entraîne un réarrangement structural du trio L-R-G et aboutit à la dissociation du complexe en trois : α_{GTP} , $\beta\gamma$ et le récepteur ligandé. La sous unité α_{GTP} et le complexe $\beta\gamma$ ainsi dissociés du récepteur interagissent alors avec leurs effecteurs intracellulaires. Comme mentionné précédemment, la sous-unité α possède une activité GTPasique intrinsèque qui restaure la forme α_{GDP} et permet sa réassociation avec le complexe $\beta\gamma$ et donc avec le récepteur.

B.5 – Les effecteurs des protéines G

Le changement de conformation de la sous unité α induit par sa liaison avec le GTP lui confère une meilleure affinité pour ses effecteurs. Il en résulte une modulation de leur activité (*activation ou inhibition*) qui permet la propagation du signal initié par la liaison de l'agoniste sur son récepteur.

Les premières études sur l'activation d'effecteurs ont laissé penser que seule la sous-unité α était capable d'activer des effecteurs intracellulaires.

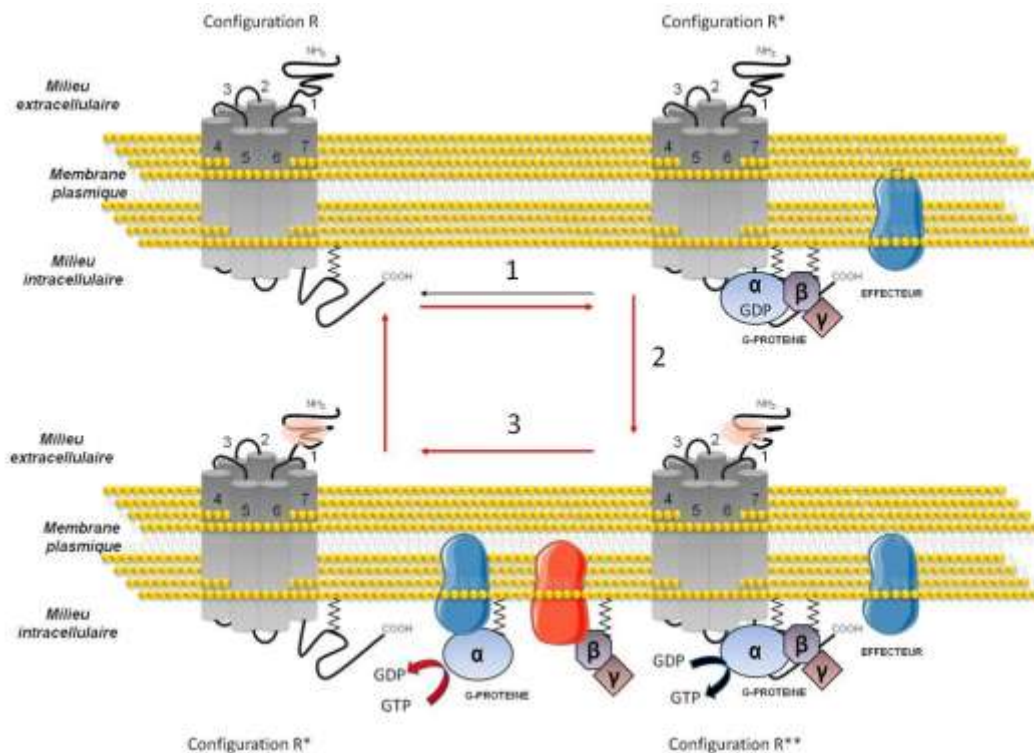


Figure I-5 : Cycle d'activation/désactivation des protéines G

A l'état basal, la protéine G est hétérotrimérique et peut-être précouplée à un RCPG non-ligandé se trouvant dans un état de repos (1). La liaison d'un agoniste (ovale rose) à ce RCPG va induire des changements conformationnels au niveau de la protéine, permettant l'échange du GDP par un GTP, réaction catalysée par le récepteur. Cela conduit à l'activation de la protéine G hétérotrimérique (2). La sous unité α liée au GTP se dissocie du complexe $\beta\gamma$ et vont agir sur leurs effecteurs respectifs (3). L'hydrolyse du GTP favorise le retour à l'état basal de la protéine G.

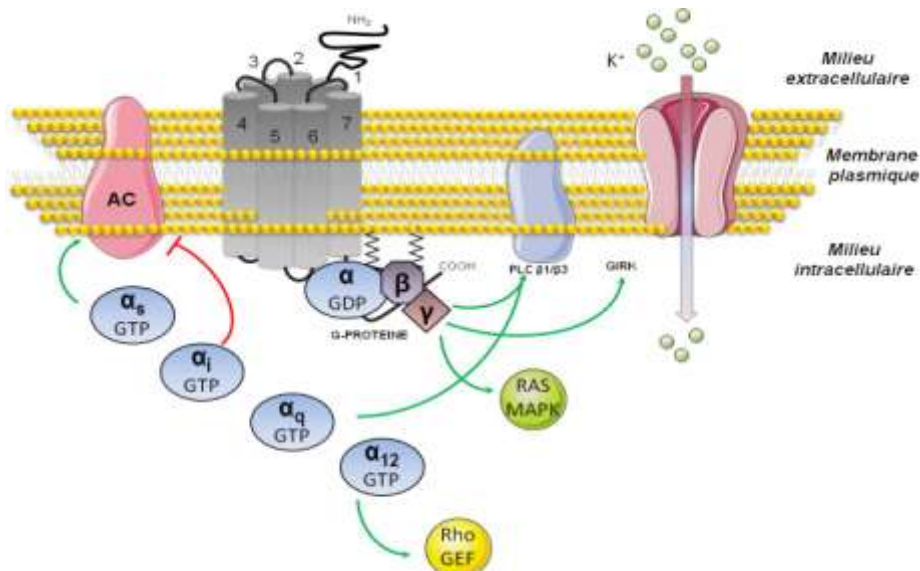


Figure I-6 : Diversité des voies de signalisation en aval d'un RCPG

Une multitude de voies de signalisation sont activées en aval des RCPG. Ces voies de signalisation résultent de l'action de la sous unité α comme du complexe $\beta\gamma$ sur leurs effecteurs intracellulaires respectifs comme l'adénylate cyclase (AC), les RhoGEF, la voie des MAPK, GIRK,...

Maintenant, il est reconnu que le dimère $\beta\gamma$ est capable d'activer des effecteurs intracellulaires spécifiques (*MAPK–Mitogen Activated Protein Kinase*, *PLC–PhosphoLipase C*, *GRK–G protein-coupled Receptor Kinase*,...) (Figure I-6).

B.5.1 – Les effecteurs activés par la sous-unité $G\alpha$

L'adénylate-cyclase (AC)

L'AC est une enzyme membranaire qui synthétise l'AMPc à partir de l'ATP (**A**dénosine **T**ri**P**hosphate). La réaction nécessite du magnésium (Mg^{2+}) et provoque la libération de pyrophosphate (PPi). L'AMPc joue le rôle de messenger secondaire en devenant à son tour un activateur allostérique de plusieurs effecteurs intracellulaires, dont le plus connu est la PKA. Cependant l'AMPc est capable de lier d'autres effecteurs tel que le facteur d'échange Epac (**E**xchange **P**rotein directly **A**ctivated by **c**AMP) et les canaux HCN (**H**yperpolarization activated **C**yclic **N**ucleotide gated channel) ou CNG (**C**yclic **N**ucleotide **G**ated channel). Le détail des voies de signalisation impliquant ces effecteurs sera abordé au cours du 4^{ème} chapitre sur l'AMPc et ses effecteurs.

Actuellement chez les mammifères, on compte 9 isoformes membranaires d'AC (1 à 9) résultant de gènes différents (Krupinski, Coussen et al. 1989) et une forme soluble (AC10), qui est exprimée essentiellement dans les testicules (Hanoune and Defer 2001). Les isoformes membranaires sont des glycoprotéines dont le poids moléculaire est compris entre 120 et 140 kDa. Toutes partagent une structure secondaire commune contenant (Figure I-7) :

- une extrémité N-terminale intracellulaire
- deux domaines transmembranaires similaires (M1 et M2) constitués chacun de six segments transmembranaires organisés en hélice α et séparés par
- une boucle cytoplasmique C1
- une extrémité C-terminale cytoplasmique appelée C2

Les régions C1 et C2 se subdivisent en deux parties distinctes C1a-C1b et C2a-C2b : C1a et C1b portent les domaines de liaison à l'ATP pour former le cœur catalytique de l'AC, tandis que C2a et C2b forment les sites régulateurs (Sprang, Chen et al. 2007; Willoughby and Cooper 2007). Les propriétés de régulation communes aux 9 formes membranaires de l'AC décrites jusqu'à présent mettent en évidence une activité basale de l'AC qui est stimulée par la sous unité α de la protéine G_s et inhibée par celle de la G_i . Les sous-unités α_i et α_s régulent différemment ces états. Par sa liaison avec le domaine C2, α_{sGTP} favorise l'hétérodimérisation entre C2a et C1a (Figure I-7.B), tandis que α_{iGTP} se lie à C1a et empêche la formation du complexe C1a-C2a (Figure I-7.A) (Sunahara, Tesmer et al. 1997).

La forskoline (FSK- diterpène dérivé de la plante *Coleus forskolii*) est un activateur connu de la plupart des isoformes membranaires de l'AC. Elle se fixe sur les sites C1a et C2a et joue le rôle de « glue moléculaire » en maintenant C1a et C2a sous forme hétérodimérique (Dessauer, Scully et al. 1997; Willoughby and Cooper 2007).

Certaines isoformes de l'AC sont modulées par le dimère $\beta\gamma$. Par exemple $\beta\gamma$ est capable de stimuler les AC2, 4 et 7 mais est aussi un puissant inhibiteur des AC1 et 8 (Sunahara and Taussig 2002). De plus, les ACs possèdent des sites de phosphorylation pour la Protéine Kinase C (PKC), la PKA et la Calmoduline-Kinase II (CaMKII). Les différents niveaux de régulations possibles sont répertoriés dans le **tableau 1.2**

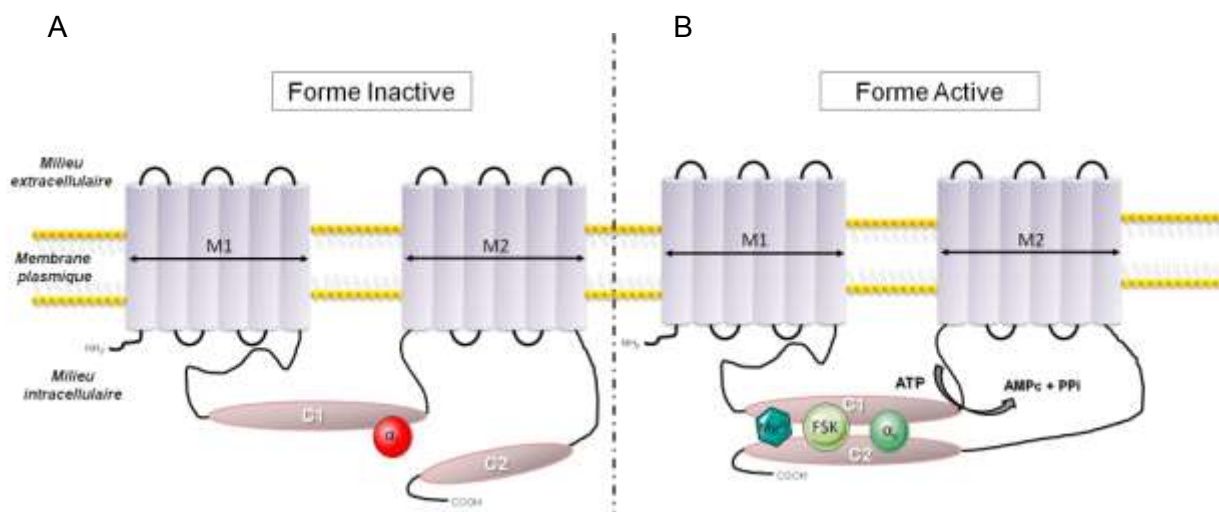


Figure I-7: Structure de l'Adénylate Cyclase

L'AC est une protéine ancrée dans la membrane cellulaire par douze domaines transmembranaires répartis en 2 régions M1 et M2. Le cœur catalytique de l'AC est formé par le rapprochement des domaines cytoplasmiques C1 et C2. L'ATP se fixe au niveau des sites de liaisons localisés sur le domaine C1 (domaine catalytique) où il sera hydrolysé en AMPc + pyrophosphate (PPi). Le domaine C2 est le domaine régulateur où se trouve le site de liaison des sous unités α de la protéine G ainsi que des sites de liaison de la forskoline (FSK) ou encore du magnésium. La sous unité de type α_i inhibe l'AC en empêchant que le cœur catalytique soit formé. A l'inverse la sous unité de type α_s stimule la formation de ce cœur catalytique en favorisant le rapprochement des domaines C1 et C2.

La phospholipase C (PLC)

L'activation de la PLC par les sous-unités de la classe $G\alpha_q$ aboutit, à partir du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) membranaire, à la synthèse du diacylglycérol (DAG) qui reste au contact de la membrane lipidique et d'inositol 1,4, 5 triphosphate (IP3) qui diffusent dans le cytoplasme. L'IP3 agit sur les canaux calciques présents sur le réticulum endoplasmique afin de provoquer la libération de calcium contenu dans ce réservoir.

AC isoforme	Localité tissulaire	Régulation par						
		protéine G			calcium	protéines kinases	FSK	
		Gas	Gai	Gβγ				
AC I	Cerveau (neurones) Glandes surrénales (medulla)	↗	↘	↘	↗ CaM	↗ PKC ↘ CaMK IV	↗	
AC II	Cerveau, muscles, poumons, cœur	↗	Ø	↗	Ø	↗ PKC	↗	
AC III	Cerveau, épithélium olfactif, pancréas, tissu adipeux brun, utérus, cœur, poumons	↗	↘	Ø	↗ CaM	↗ PKC ↘ CaMK II	↗	
AC IV	Cerveau, cœur, rein, foie, poumons, utérus, tissu adipeux brun	↗	Ø	↗		↘ PKC	↗	
AC V	Cœur, cerveau, rein, foie, poumons, utérus, tissu adipeux brun	↗	↘	↘	↘ [<1μM]	↗ PKC ↘ PKA	↗	
AC VI	ubiquitaire	↗	↘	↘	↘ [<1μM]	↘ PKA ↘ PKC	↗	
AC VII	ubiquitaire	↗	↘	↗		↗ PKC	↗	
AC VIII	Cerveau, poumons, utérus, testicules, cœur	↗	↘	Ø	↗ CaM		↗	
AC IX	Cerveau,	↗	↘		↘ calcineurine		↗	
AC X	Testicules	Aucun effet de la protéine G						

Tableau 1.2 : Diversité et régulation des AC

↗ → stimulation
 ↘ → inhibition
 Ø → aucun effet

CaM → calmodulin
 CaMK → Calmoduline kinase
 PKA / PKC → protéine kinase A / C
 FSK → Forskolin

L'élévation du calcium intracytoplasmique entraîne l'activation d'un certain nombre de processus dépendants du calcium et notamment d'une protéine prenant en charge le calcium, la calmoduline. Le complexe calcium-calmoduline peut activer d'autres enzymes telles que la

phosphodiesterase (PDE - enzyme de dégradation de l'AMPc en 5'-AMP), la phospholipase A2. Le DAG est un activateur de la PKC. Celle-ci catalyse, en présence de calcium, la phosphorylation d'un grand nombre de substrats intervenant dans la différenciation cellulaire, la mitose, l'exocytose, et d'autres processus cellulaires.

Autres effecteurs des sous-unités α

D'autres types de phospholipases telles que les phospholipases D et A2 peuvent également être activées par des sous-unités $G\alpha$. La GMP cyclase est également un effecteur des protéines G. De plus, certains canaux ioniques, notamment à conductance potassique ou calcique, voient leur activité modulée par certaines sous-unités de la classe α_i .

B.5.2 – Les effecteurs activés par le complexe $\beta\gamma$

Jusqu'à la fin des années 90, le complexe $\beta\gamma$ était considéré comme ne servant qu'à capter la sous-unité α liée au GDP pour la remettre dans un nouveau cycle d'activation. Cependant l'intérêt pour $\beta\gamma$ s'est amplifié suite à la mise en évidence de son rôle d'activateur direct des canaux potassiques de la rectification entrante (GIRK) (Yamada, Inanobe et al. 1998). L'ouverture de ces canaux permet une hyperpolarisation du neurone sur lequel ils se trouvent et joue donc un rôle très important dans la modulation de la propagation des signaux au sein du système nerveux. De plus, le complexe $\beta\gamma$ diminue l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type N, responsables de la libération de neurotransmetteurs au niveau d'une synapse entre deux neurones via une interaction directe avec le canal (Dascal 2001).

Le complexe $\beta\gamma$ peut aussi activer la phospholipase A2, certaines phospholipases β , certaines AC, mais aussi la phosphoinositol 3 Kinase (PI3K) et les MAPK par des mécanismes faisant intervenir la protéine Src (Proto oncogene tyrosine protein kinase) (Clapham and Neer 1997; Luttrell, Della Rocca et al. 1997). De manière intéressante, l'activité de GRK2 et GRK3 (**G** protein **R**eceptor **K**inase) est augmentée par $\beta\gamma$, ce qui suggère un rôle de rétrocontrôle négatif de ce complexe en favorisant la désensibilisation du récepteur (cf. chapitre I -§ C.3) (Clapham and Neer 1997).

Les effecteurs activés peuvent varier selon les sous-unités β et γ considérées. Ainsi, la phospholipase C interagit préférentiellement avec le complexe $\beta_1\gamma_1$, alors que la sous-unité β_5 semble plus spécifique de la stimulation de la PLC que des MAPK. De même, β_3 , β_4 , β_5 diffèrent de β_1 et β_2 par leurs interactions avec des fragments de l'AC2 et GIRK1 dans des expériences de double hybride (Hildebrandt 1997).

Ainsi les protéines G peuvent activer de nombreux effecteurs intracellulaires qui eux-mêmes activent d'autres protéines. Par conséquent, ces protéines sont à l'origine de nombreuses voies de transduction ce qui explique, en partie, l'implication des RCPG dans de nombreux processus physiologiques ou physiopathologiques.

C] Régulation de l'activité des RCPG

L'activité des RCPG repose sur un équilibre entre les mécanismes d'activation de la cascade de réactions qu'ils déclenchent et ceux qui aboutissent à leur inactivation et gouvernent l'arrêt de la réponse, permettant ainsi une meilleure adaptation de la cellule à un environnement en perpétuel changement

C.1– Elimination du ligand

Le signal intracellulaire peut être limité par l'arrêt de la présence du ligand dans le milieu extracellulaire. Deux mécanismes conduisent à la suppression du ligand du milieu extracellulaire. Soit il est éliminé par recapture via des transporteurs spécifiques, comme c'est le cas de nombreux neurotransmetteurs (*sérotonine, noradrénaline,...*) au niveau des synapses cérébrales, soit il est dégradé par des enzymes protéolytiques contenues dans le milieu extracellulaire, comme cela peut être le cas des chimiokines tel que le CCL2.

C.2 – Régulation par les RGS (Regulator of G protein Signalling)

Bien que les protéines G soient capables d'hydrolyser, elles-mêmes, le GTP qu'elles portent, le processus est extrêmement lent et n'est pas représentatif de la vitesse à laquelle le signal des RCPG est arrêté in vivo. Par exemple, le temps de demi vie de l'hydrolyse du GTP est de 15s pour la sous-unité α purifiée tandis que la désactivation des signaux visuels associés est de 0,2s (Bockaert, Claeyssen et al. 2002).

Dans le milieu des années 1990, une famille de protéines, les RGS, a été identifiée pour sa capacité à réguler le signal des RCPG. Les RGS ont été identifiés pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* pour leur rôle dans l'inhibition des protéines G. Ces protéines sont des GAP (**G**TPase-**A**ccelerating **P**rotein). Les RGS ne possèdent pas d'activité GTPasique à proprement parler mais elles modulent le signal des RCPG en accélérant le taux d'hydrolyse du GTP par la sous unité α réduisant ainsi la durée et l'amplitude du signal des RCPG dépendant des protéines G. La protéine G retourne alors dans son état inactif, liée au GDP. Puisqu'elles

facilitent la réassociation de la sous unité α avec le complexe $\beta\gamma$, on considère que les RGS inhibent également la signalisation induite par le dimère $\beta\gamma$.

La famille des RGS comprend plus de 30 membres, dont les tailles varient de 17 à 160 kDa et qui peuvent être soit membranaires soit cytosoliques. La signature des protéines de cette famille consiste en un domaine RGS de 120 résidus par lequel elle lie la sous-unité α et qui est responsable de la fonction GAP. On distingue deux classes de RGS : les petites protéines RGS (160 à 217 aa) qui ne possèdent que le domaine RGS encadré par de courtes extrémités N- et C-terminales et les grandes protéines RGS (372 à 1387 aa) qui contiennent des motifs additionnels permettant des liens entre les protéines G hétérotrimériques et d'autres voies de signalisation. Globalement leur rôle est de permettre la réassociation de l'hétérotrimère en fin de cycle (Chasse and Dohlman 2003; McCudden, Hains et al. 2005).

C.3 – Désensibilisation

La désensibilisation est un processus de régulation crucial pour la cellule. Il consiste à contrôler finement la durée de la stimulation cellulaire induite par un RCPG donné, empêchant une stimulation excessive.

On distingue deux types de désensibilisation : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue. La désensibilisation homologue désigne une perte de réponse d'un RCPG à la suite de sa stimulation par son ligand, alors que dans le cas de la désensibilisation hétérologue, la perte de réponse du RCPG, fait suite à une stimulation d'une autre famille de récepteurs co-exprimés à la surface de la cellule. Cette désensibilisation est possible notamment par l'intermédiaire des kinases intracellulaires activées à la suite des seconds messagers.

L'événement le plus précoce, au cours de la désensibilisation, homologue comme hétérologue, correspond à une phosphorylation des résidus thréonine et sérine situés au niveau de la région C-terminale du récepteur. Cette phosphorylation démarre quelques secondes après l'activation du récepteur (Bouvier, Hausdorff et al. 1988). Les familles de protéines à l'origine de cette phosphorylation diffèrent en fonction du type de désensibilisation. Néanmoins, leur effet est comparable : elles sont à l'origine d'une inhibition du couplage du récepteur avec les protéines G.

C.3.1 – Désensibilisation homologue

Dans le cas de la désensibilisation homologue, la phosphorylation se fait par des kinases spécifiques de la famille des RCPG, les GRK. La famille des GRK est composée de sept membres qui présentent de fortes similitudes de séquence et qui appartiennent à la famille des sérines/thréonines kinases. Elles possèdent toutes un domaine catalytique central et une extrémité N-terminale importante pour la reconnaissance des RCPG. L'extrémité C-terminale est impliquée dans des interactions protéine-protéine et dans l'adressage des kinases vers la membrane et les récepteurs.

Fonctionnellement les GRK présentent trois caractéristiques (Pitcher, Hall et al. 1998) :

- Elles phosphorylent préférentiellement les récepteurs en conformation active et lié à l'agoniste plutôt que les récepteurs inactifs ou liés à un antagoniste.
- L'interaction avec les récepteurs augmente leur activité.
- Leur adressage à la membrane est finement régulé par une multitude de mécanismes dont certains impliquent le complexe $\beta\gamma$.

Les GRK phosphorylent le récepteur au niveau de l'extrémité C-terminale (Lefkowitz, Pitcher et al. 1998). La phosphorylation du récepteur par une GRK permet la liaison d'une β -arrestine au récepteur. L'arrivée de la β -arrestine au niveau du récepteur masque les séquences d'interaction avec les sous-unités α , ce qui a pour conséquence d'inhiber stériquement l'interaction entre le récepteur et la protéine G et contribue à un arrêt du signal.

C.3.2 – Désensibilisation hétérologue

Ce phénomène est lié au fait que les kinases dépendantes des seconds messagers phosphorylent non seulement les récepteurs activés par leurs ligands mais aussi d'autres familles de récepteurs inactifs.

La phosphorylation du récepteur dans le cadre d'une désensibilisation hétérologue est assurée par les protéines kinases activées par les seconds messagers : PKA et PKC. Elles catalysent le transfert d'un groupe phosphate issu d'une molécule d'ATP vers une sérine ou thréonine contenue à l'intérieur d'une séquence consensus d'une protéine donnée, ici le récepteur. Ces kinases PKA et PKC sont activées en réponse à l'augmentation intracellulaire de seconds messagers induits par un RCPG, tels que l'AMPc, le calcium ou le DAG et participent à la phosphorylation de protéines cibles en aval de la voie de signalisation du RCPG considéré.

D'un point de vue moléculaire, le processus est équivalent à celui déclenché par les GRK puisque ce sont les groupements phosphates qui favorisent le découplage du récepteur de la protéine G par un encombrement stérique, ainsi que le recrutement des β -arrestines conduisant ainsi à l'internalisation du récepteur afin d'interrompre le signal. Ce mécanisme serait prédominant dans le cas des faibles concentrations en agonistes (Ferguson 2001).

C.4 – Internalisation des RCPG dépendante des β -arrestines

C.4.1 – Internalisation constitutive des RCPG

A l'état inactif, les RCPG subissent une internalisation, dont le taux est relativement bas par rapport à une internalisation induite par le ligand. En plus de contribuer à l'homéostasie cellulaire, l'internalisation constitutive des RCPG pourrait servir à maintenir une réserve interne de récepteurs pour remplacer ceux qui sont désensibilisés après une exposition aux ligands.

C.4.2 – Internalisation dépendante du ligand

Après l'étape de désensibilisation par les GRK, la liaison des β -arrestines au récepteur permet le découplage de la protéine G et engage le récepteur dans le processus d'endocytose (Figure I-8). Les RCPG sont en général internalisés par une voie classique passant par la formation de puits recouverts de clathrine autour du récepteur. Si le plus souvent cette endocytose participe au recyclage des récepteurs phosphorylés et donc à la re-sensibilisation du système, elle peut également marquer la première étape de la dégradation des récepteurs (Figure I-8). Dans les deux cas de figure, les β -arrestines 1 et 2 vont jouer un rôle primordial. En se fixant préférentiellement à un RCPG phosphorylé (Rasmussen, Novak et al. 2004), elles établissent un pont moléculaire entre le récepteur à internaliser et les protéines clés de la machinerie d'endocytose. En effet, les β -arrestines vont recruter un ensemble de partenaires, dont l'adaptateur AP-2 et la clathrine et participer à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine, au sein de laquelle se retrouve le récepteur à internaliser. Cette vésicule s'invagine vers l'intérieur de la cellule. Une petite GTPase, la dynamine, va ensuite assurer la scission des membranes pour créer une vésicule d'endocytose contenant les récepteurs toujours attachés à la membrane. Cette vésicule nouvellement formée rejoindra, grâce au cytosquelette de la cellule, le réseau vésiculaire où son contenu sera trié (Figure I-8) (Volovyk, Wolf et al. 2006; Wolfe and Trejo 2007).

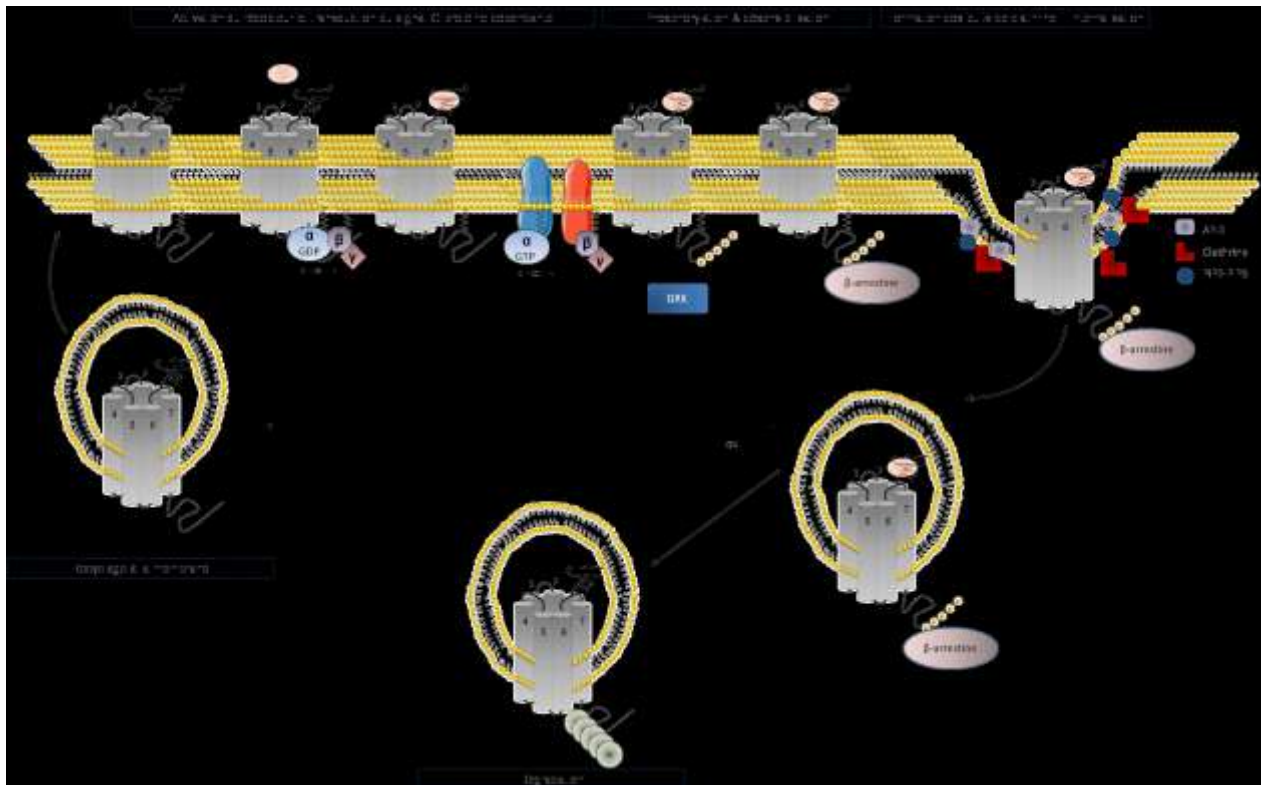


Figure I-8 : Modèle « classique » de l'internalisation β -arrestine dépendante des RCPG

Après l'activation de la protéine G suite à la liaison du ligand sur le RCPG, les GRK phosphorylent l'extrémité C-terminale du récepteur. Les β -arrestines sont recrutées et viennent se lier aux domaines intracellulaires phosphorylés, recrutant à leur tour les différents composants de la machinerie d'endocytose, comme la protéine AP-2 et la clathrine. Les récepteurs internalisés sont soit recyclés à la membrane après élimination du ligand soit dégradés dans les lysosomes.

D] Transduction du signal non-conventionnelle

Dès la fin des années 1990, certains résultats suggéraient que des RCPG étaient capables de signaler sans recourir aux protéines G ou encore que ces récepteurs continuaient à signaler tout en étant dans les vésicules d'endocytose (Calebiro, Nikolaev et al. 2009; Lohse and Calebiro 2013).

D.1– Transduction du signal dépendant des protéines G par des RCPG internalisés

Le schéma d'internalisation actuel des RCPG suppose le fait que le signal dépendant des protéines G est transmis exclusivement depuis la membrane plasmique alors que le signal dépendant des β -arrestines est plutôt transmis au niveau des compartiments endosomaux.

En 2009, trois études, réalisées au sein de trois groupes différents, présentent de solides preuves de l'existence d'un signal AMPc persistant qui émane de RCPG internalisés.

La première étude du groupe de Martin Lohse (Calebiro, Nikolaev et al. 2009) utilise un modèle transgénique de souris exprimant de manière ubiquitaire une sonde mesurant l'AMPc, la sonde EPAC, afin d'étudier le signal AMPc persistant dans des cellules de thyroïde fraîchement isolées. Ils observent que suite à une stimulation du récepteur TSHR par son ligand naturel, le récepteur et son ligand sont rapidement internalisés via un mécanisme principalement dépendant de la β -arrestine 2 et migrent jusqu'à des vésicules périnucléaires. Cependant, malgré l'internalisation du récepteur, les niveaux d'AMPc intracellulaires restent très élevés. Les résultats de cette étude, incluant des effets d'inhibiteurs d'endocytose et des techniques de fractionnement cellulaire, montrent que les protéines G et l'AC sont présentes au niveau des membranes des vésicules d'endocytose contenant les récepteurs internalisés et que ces complexes internalisés continuent de transduire un signal dépendant des protéines G. A la différence du signal membranaire qui est rapidement réversible, le signal provenant des récepteurs internalisés continue en l'absence de stimulation TSH. Ce signal AMPc persistant induit par le récepteur TSH internalisé, serait crucial pour assurer la fonction sécrétoire de la thyroïde (Calebiro, Nikolaev et al. 2009) (Figure I-9.A).

Rapidement après la première étude sur le récepteur de la TSH, Ferrandon et collègues (Ferrandon, Feinstein et al. 2009) publient une étude similaire sur le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH). Le récepteur PTHR possède deux ligands naturels, l'hormone endocrine PTH, et la PTHrP (**Para**Thyroid **H**ormone-related **P**rotein), un facteur autocrine. Ces deux peptides déclenchent un signal de durée différente (Figure I-9.B). Les résultats de cette étude montrent que la stimulation par PTH induit une internalisation rapide du récepteur dans les endosomes précoces, en association avec l'AC. Les complexes PTH-PTHR internalisés ne sont pas associés avec une désensibilisation de la voie AMPc mais plutôt avec un signal AMPc persistant. A l'inverse, le PTHrP présente un profil de signalisation membranaire et rapidement réversible (Ferrandon, Feinstein et al. 2009).

La troisième étude montre que le récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P1), couplé à G_i/G_q , émet un signal persistant dépendant de la protéine G_i , une fois le récepteur internalisé. Une stimulation du récepteur par son ligand, le S1P1, combiné à une molécule immunomodulatrice, FT720 induit un signal d'inhibition de l'AMPc permanent passant par la voie G_i , et ceux après l'internalisation du récepteur. A l'inverse le signal calcique dépendant de la protéine G_q reste lui restreint à la membrane plasmique (Mullershausen, Zecri et al. 2009)

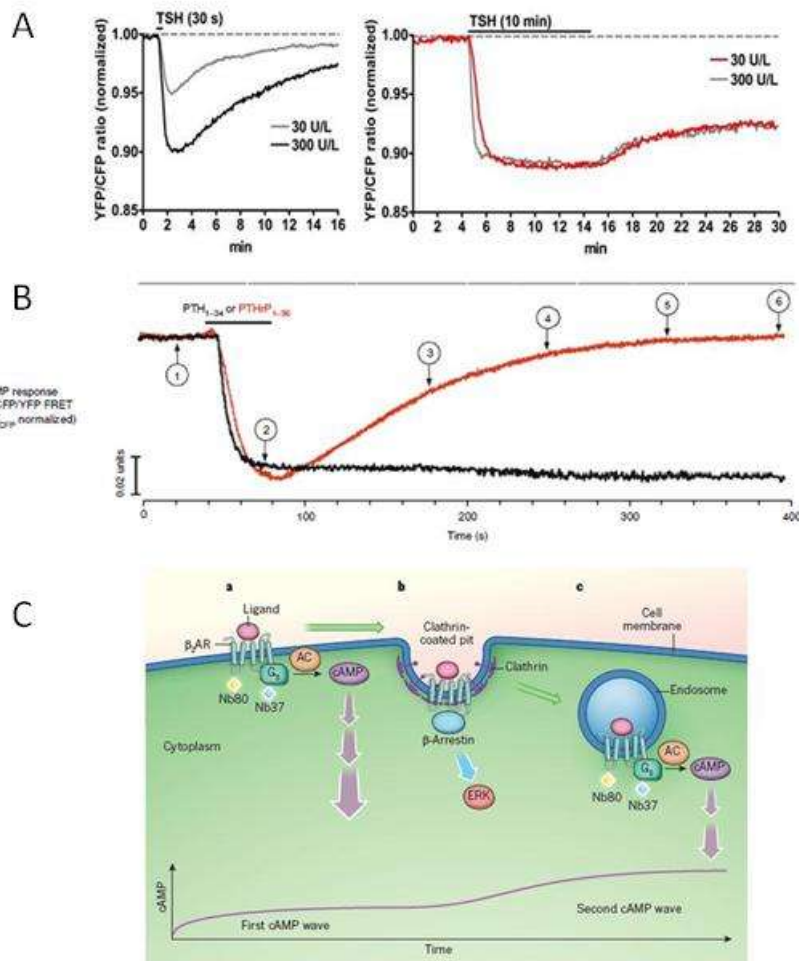


Figure I-9 : Résultats principaux issus de différentes études sur la transduction du signal AMPc par des récepteurs internalisés.

A- Cinétique de la réponse AMPc, observée par FRET, en aval du récepteur de l'hormone TSH en fonction du temps de présence du ligand dans le milieu extracellulaire. Les auteurs constatent deux types de réponse : réversible (courbe noire et grise) et une réponse permanente (courbe rouge). La réponse permanente semble émaner d'un groupe de récepteur internalisés mais encore lié à la protéine G et qui continue de stimuler l'adénylate cyclase de type 3. D'après Calebiro, Nikolaev et al. 2009.

B- Cinétique de la réponse AMPc, observée par FRET, en aval du récepteur de l'hormone PTH en fonction du ligand : PTH ou PTHrP. La cinétique de la réponse AMPc est différente en fonction de ce paramètre, en effet alors que le récepteur activé par la PTH induit une réponse rapide mais réversible (courbe rouge) contrairement au PTHrP qui induit une réponse permanente (courbe noire). D'après Ferrandon, Feinstein et al. 2009.

C- Modèle proposé pour expliquer les deux types de réponse, réversible et permanente, en aval du récepteur de la TSH. A l'aide de nanoparticules se liant spécifiquement au récepteur non lié à la β -arrestine (Nb 80) ou à la protéine G (Nb 37). De cette manière, les auteurs confirment qu'en plus d'un couplage récepteur-protéine G à la membrane, responsable d'une première vague de réponse AMPc (a), il y a un « re-couplage » du récepteur avec la protéine G au niveau des endosomes (c), après l'étape d'internalisation du récepteur par le mécanisme β -arrestine dépendant (b). Ce re-couplage est à l'origine d'une seconde vague de réponse, certainement la réponse persistante décrite dans l'article précédent. D'après Lohse and Calebiro 2013.

Très récemment, l'étude de ces signaux via des récepteurs internalisés a été accélérée par le développement de nouveaux outils de mesure comme par exemple les « nanobodies » ou anticorps à domaine unique permettant de cibler le récepteur internalisé couplé à la protéine G (Lohse and Calebiro 2013). De ce fait, le nombre de récepteur capable de signaler après leur

internalisation n'a cessé d'augmenter, c'est le cas notamment du récepteur β 2-adrenergique (Irannejad, Tomshine et al. 2013), le récepteur GLP-1R (Glucagon like peptide-1 Receptor) (Urano, Jones et al. 2012) ou encore celui de la vasopressine (Hewavitharana and Wedegaertner 2012).

Ces données posent une multitude d'autres questions : comment l'existence de ces complexes de récepteurs internalisés avec leurs protéines G est conciliable avec leur internalisation dépendante des β -arrestines ? D'autre part, comment expliquer cette dernière étude qui est venue contredire les autres observations ? Ainsi, ces découvertes nécessitent des travaux complémentaires pour déterminer l'existence in vivo de ces complexes de RCPG internalisés associés aux protéines G ainsi que leurs rôles physiologiques.

D.2– Transduction du signal indépendant des protéines G

Outre leurs rôles classiques connus, de plus en plus d'études portent sur la signalisation des RCPG indépendante de l'activation de la protéine G. Ces voies sont très difficiles à mettre en évidence dans la mesure où il existe une large variété de récepteurs exprimés dans un même tissu. Il résulte de cette co-expression une réponse cellulaire extrêmement complexe, ce qui rend très difficile l'étude de la voie de signalisation liée à un seul récepteur. Ces voies de signalisation sont donc étudiées en exprimant indépendamment chaque récepteur dans un système d'expression hétérologue, approche largement critiquée puisque le récepteur est sorti de son contexte naturel. En effet, on peut facilement imaginer que la réponse est dépendante du tissu et du taux d'expression des protéines impliquées dans la signalisation, et de la stœchiométrie des différents partenaires ce qu'il est impossible de reproduire en système d'expression hétérologue. Néanmoins, cette approche, même si elle est contestée reste la meilleure pour mettre en évidence de telles voies de signalisation.

D.2.1 – Activation des différentes voies MAPK

Les MAPK sont des sérines/thréonines kinases qui regroupent les ERK1/2, c-jun NH2-terminal kinases (JNK) et p38/MAPK. La cascade de phosphorylation Ras/Raf/ERK-kinases/ERK1/2 conduit à la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose cellulaire, que ces kinases modulent en activant par phosphorylation des facteurs de transcription. L'activation de cette voie en aval d'un RCPG diffère selon le récepteur et le type de cellule. Cette voie de signalisation peut être induite par 4 mécanismes distincts (Figure I-10) :

- Mécanisme déclenché par les protéines kinases A et C (Gutkind 1998)
- Mécanisme déclenché par les β -arrestines (Luttrell, Della Rocca et al. 1997)

- Mécanisme de transactivation des récepteurs à tyrosine kinases (Lowes, Ip et al. 2002; Piiper and Zeuzem 2004)
- Mécanisme déclenché par interaction directe avec le récepteur (Guillet-Deniau, Burnol et al. 1997)

D.2.2 –Autres voies de signalisation

On trouve dans la littérature de plus en plus d'études qui montrent que les boucles intracellulaires et le domaine C-terminal des RCPG présentent des motifs structuraux caractéristiques des interactions protéine/protéine, qui prévoient des liaisons avec d'autres protéines que les partenaires classiques des RCPG (*G-protéines*, *GRK* et *β -arrestines*). Ces protéines qui se lient directement aux RCPG semblent participer à l'assemblage et à la cohésion d'un véritable échafaudage protéique fonctionnel autour du récepteur (Brzostowski and Kimmel 2001; Milligan and White 2001)

L'engouement observé depuis une vingtaine d'années pour l'étude des RCPG va sans doute se poursuivre pour mettre en évidence toutes ces voies de signalisation nouvellement découvertes. D'un point de vue médical en effet, les principales études se sont portées sur la recherche de nouveaux ligands du récepteur impliqué dans la pathologie, mais sans doute est-il plausible de vouloir trouver des molécules interagissant à une autre étape de la voie de signalisation, encore faut-il que cette voie soit connue.

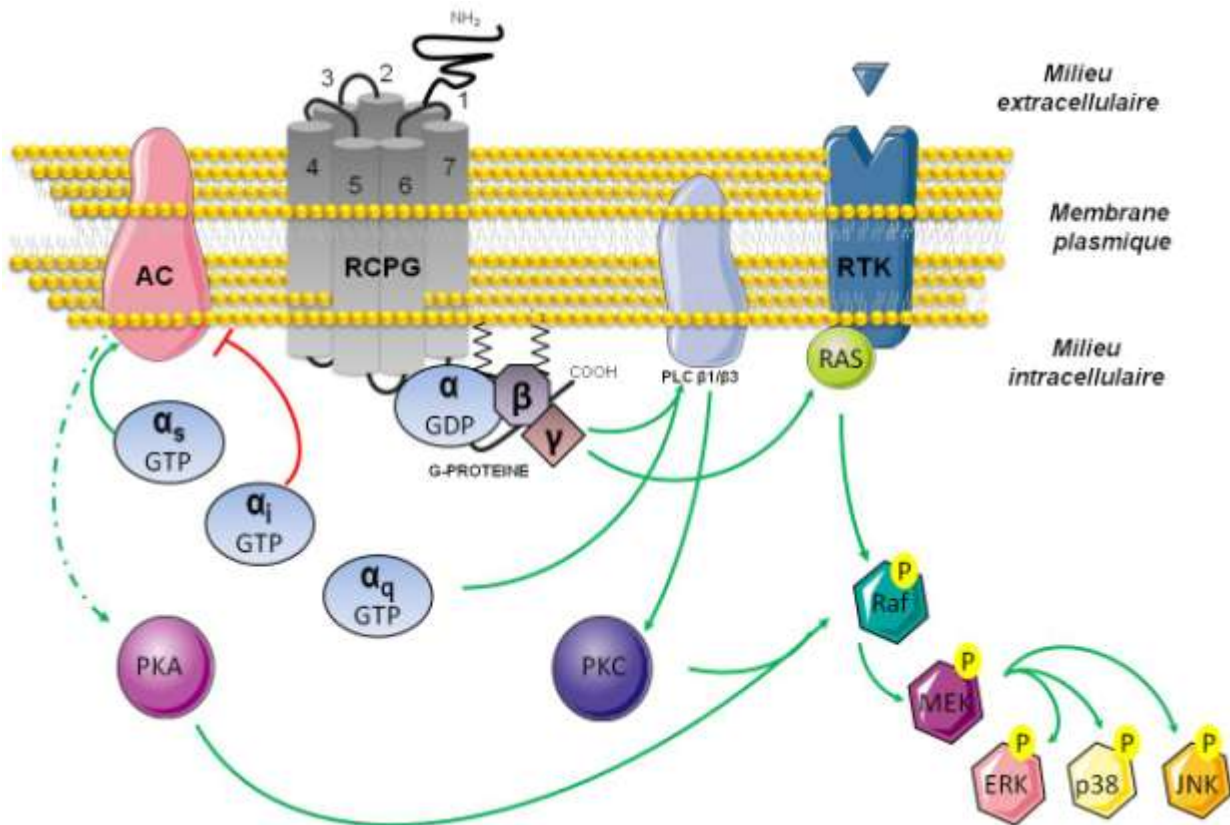


Figure I-10 : Activation de la voie MAPK par les différents acteurs de la signalisation cellulaire. La cascade MAPK/MAPKK peut être activées par différents partenaires cellulaires, dont les Récepteurs de type Tyrosine Kinase (RTK), les PKA et PKC faisant suite à l'activation préalable de RCPG. Une activation directe de la voie par le récepteur est également possible mais non représentée sur ce schéma simplifié.

II. Le Système Chimiokine/ Récepteur de chimiokine

Durant la dernière décade, les mécanismes qui régissent le trafic des leucocytes, en conditions physiologique ou pathologique, ont été mieux compris. Contrairement à l'idée ancienne d'une migration au hasard des leucocytes vers les tissus, il a été démontré que la migration des leucocytes était un processus étroitement régulé mettant en jeu des interactions récepteurs-ligands (Springer 1995). De nombreuses molécules sont décrites comme responsables de cette attraction cellulaire coordonnée, parmi lesquelles la molécule du complément C5a, le leukotriène B₄ ou encore le peptide bactérien formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP). Cependant grâce à une expression spécifique à des sous-populations cellulaires, les chimiokines et leurs récepteurs sont les molécules chimio-attractantes qui contribuent largement à ce phénomène de recrutement et migration des leucocytes, aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques (Rossi and Zlotnik 2000). Leur implication dans le système immunitaire ne se cantonne cependant pas à la migration cellulaire dans des conditions pathologiques inflammatoires. Les chimiokines interviennent aussi dans la régulation physiologique du trafic leucocytaire dans les organes et vaisseaux lymphoïdes ainsi que dans la maturation, la différenciation et l'activation de différentes sous-populations de cellules de l'immunité (Moser and Willmann 2004; Ebert, Schaerli et al. 2005; Lapidot, Dar et al. 2005; Schaerli and Moser 2005). Plus récemment, il a été démontré que les chimiokines jouent un rôle déterminant dans des phénomènes non-immuns comme le développement embryologique et la neuromodulation au sein du système nerveux central (Rostene, Guyon et al. 2011), l'angiogenèse, le trafic et le « homing » des cellules souches mésenchymateuses ou encore la croissance et la migration tumorale (Rollins 1997; Luster 1998; Rossi and Zlotnik 2000; Strieter, Burdick et al. 2005) (Figure II-1).

A] Les Chimiokines

En 1987, le groupe de Yoshimura identifie un facteur soluble sécrété par des monocytes activés et présentant des propriétés chimio-attractantes vis-à-vis des neutrophiles. Ce facteur est nommé interleukine 8 (IL-8) selon la nomenclature en usage à l'époque, interleukine désignant une cytokine sécrétée par et agissant sur les leucocytes. Il faudra attendre les années 90' et le troisième Symposium international dédié à ces cytokines chimio-attractantes, pour que le terme de chimiokine soit officiellement adopté.

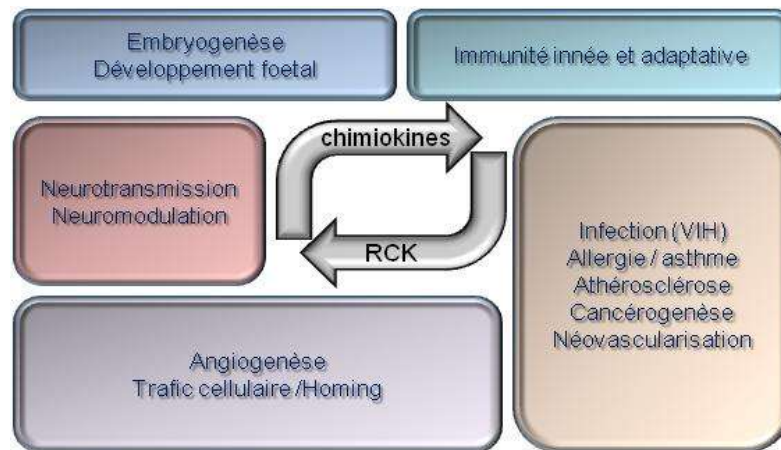


Figure II-1 : Représentation schématique de l'implication du système chimiokinergique dans différents processus physiologiques et physiopathologiques.

A.1 – Classification structurale et fonctionnelle

Les chimiokines sont des protéines de faibles poids moléculaire constituées de 60 à 80 aa. Une cinquantaine de chimiokines ont été identifiées à ce jour. Cette famille de protéines est caractérisée par une homologie de séquence en aa variant de 20% à 80%, ainsi qu'un motif commun incluant deux ou quatre cystéines conservées. Les chimiokines sont ainsi répertoriées structuralement selon le nombre d'acides aminés qui séparent les deux premières cystéines situées en N-terminal et constituent quatre grandes familles : C-, CC-, CXC- et CX3C- (Figure II-2).

Les chimiokines peuvent également être classées selon leur expression qui peut être constitutive ou inducible (**Tableau 2.1**). En effet certaines chimiokines, considérées comme « homéostatiques », sont produites constitutivement par des tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes (*peau, muqueuse, ...*). Elles ont un rôle de régulation de la production et de la distribution des leucocytes, aussi sont-elles essentiellement impliquées dans la veille immunitaire.

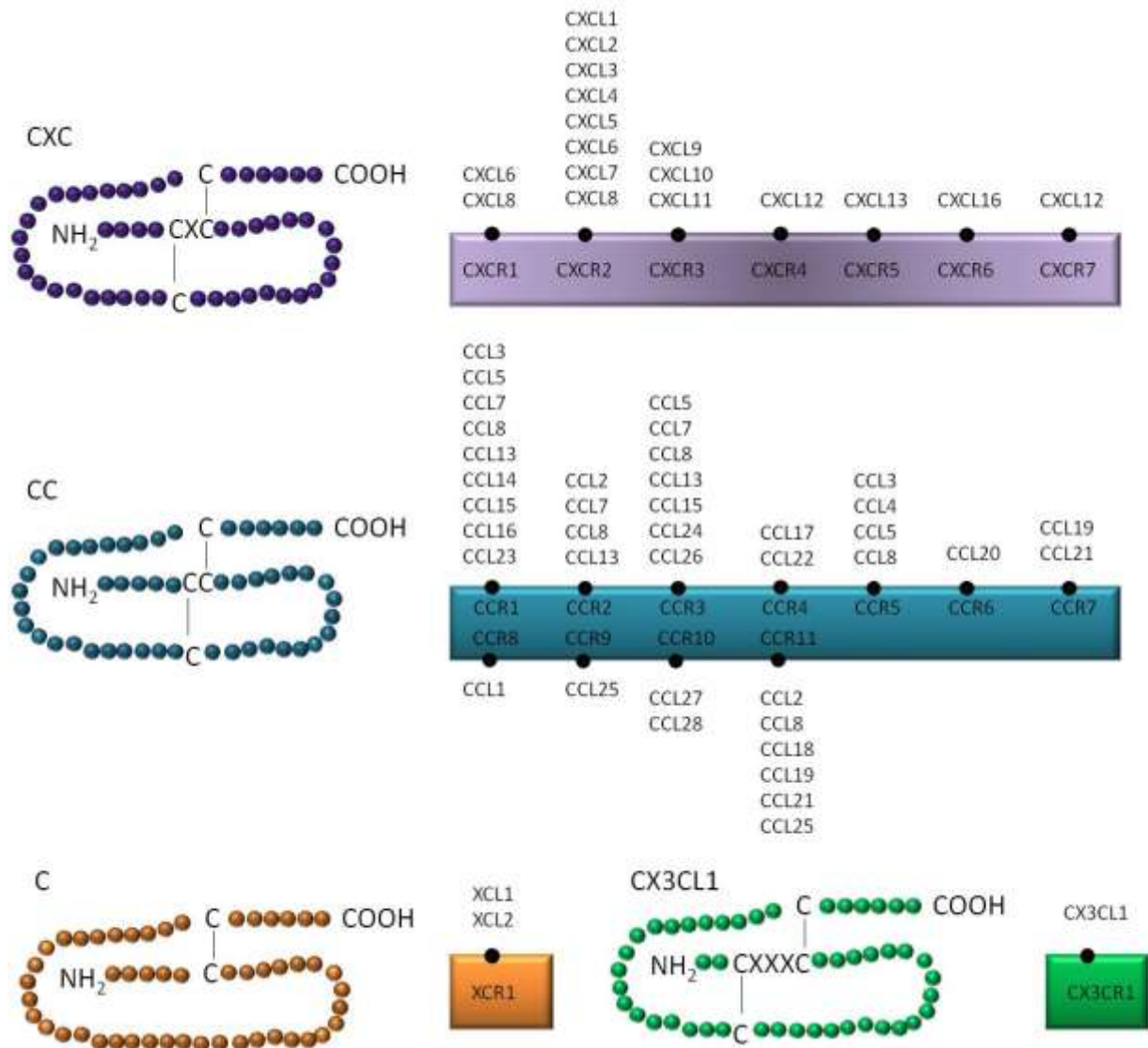


Figure II-2 : Représentation schématique de la structure protéique des 4 sous familles des chimiokines humaines. A gauche : représentation de la structure de chaque sous-famille de chimiokines. A droite : représentation de la redondance caractéristique de la relation des chimiokines avec leurs récepteurs symbolisés par les rectangles.

La majorité des chimiokines sont qualifiées d'inflammatoires car leur production n'est observée que dans un contexte d'inflammation ou d'infection. Ces chimiokines peuvent être sécrétées soit directement par le tissu inflammé lui-même (*endothélium vasculaire, épithélium*) ou par des leucocytes infiltrants (*macrophages, lymphocytes T, ...*). Ces chimiokines sont synthétisées au sein des cellules après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (*IL-1 α , TNF- α , IFN- α , ...*) (Brown, Gerritsen et al. 1994; Graves and Jiang 1995) ou après contact avec un agent pathogène (virus, LPS = lipopolysaccharide, un composant majeur de la membrane bactérienne) (Baggiolini, Dewald et al. 1997; Mahalingam and Karupiah 1999). Le rôle de ces chimiokines est d'induire la migration des leucocytes (*monocytes, neutrophiles et autres cellules*

effectrices) depuis le sang vers le site de l'inflammation et d'activer les cellules immunitaires afin d'enclencher une réponse immunitaire.

Cette distinction constitutive/inductible n'est toutefois pas absolue, certaines chimiokines comme CX3CL1 ou CCL20, appartiennent aux deux catégories (**Tableau 2.1**).

A.1.1 – Les CXC-chimiokines

Initialement appelée α -chimiokines, les membres de cette première sous-famille de chimiokines se distinguent par le fait que les deux premières cystéines sont séparées par un seul aa d'où leur nom CXC- (**Figure II-2**). Actuellement, environ 14 CXC-chimiokines ont été identifiées chez l'Homme, parmi lesquelles l'Interleukine-8 appelée CXCL8 dans la nomenclature systématique. Les gènes humains codant ces protéines sont localisés sur le chromosome 14 dans la région q12-21, à l'exception du gène CXCL12 qui est localisé sur le chromosome 10. Ce groupe CXC- peut être subdivisé en deux sous-catégories selon la présence ou non d'un motif tripeptidique N-terminal : ELR (Glutamate-Leucine-Arginine), qui confère aux chimiokines, qui le portent, des propriétés angiogéniques. Ainsi leur implication est souvent rapportée au cours de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, lors du développement embryonnaire, des processus de cicatrisation mais aussi au cours des développements tumoraux ou inflammation chroniques (Strieter, Pober et al. 1995; Strieter, Pober et al. 1995; Rossi and Zlotnik 2000). La présence de ce motif confère à la chimiokine une activité chimiotactique spécifique pour les neutrophiles, alors que son absence oriente cette activité vers les lymphocytes et les monocytes. Les chimiokines ELR⁻ sont décrites, exception faite pour le CXCL12, comme des angiostatiques, inhibant l'effet angiogéniques du groupe ELR⁺.

A.1.2 – Les CC-chimiokines

Les membres de la sous-famille des CC-chimiokines, la plus importante en termes de nombre (27 actuellement recensés) se distinguent par le fait que les deux cystéines N-terminales sont adjacentes. Dans la majorité des cas, les gènes humains codant ces protéines sont localisés sur la région q11.2-12 du chromosome 17. Il existe toutefois des exceptions à cette règle puisque le gène codant CCL19 est localisé sur le chromosome 9 et celui codant CCL20 se situe au niveau du chromosome 2.

Chimiokines			Récepteurs	
Famille	Dénomination commune	Dénomination officielle	Dénomination officielle	Expression leucocytaire
CXC-	IL-8	CXCL8	CXCR1	Neutro Ψ
	CCP-2	CXCL6		
	NAP-2	CXCL7		
	ENA-78	CXCL5	CXCR2	Neutro Ψ
	Gro- α	CXCL1		
	Gro- β	CXCL2		
	Gro- γ	CXCL3		
	IP-10	CXCL10	CXCR3	LT _{eff} /NK
	Mig	CXCL9		
	I-TAC	CXCL11	CXCR7	Tumeurs
	SDF-1 α/β	CXCL12	CXCR4	Mono / L _B
	SCA-1	CXCL13	CXCR5	L _B
	-	CXCL16	CXCR6	DC/ LT _{act}
	BRAK	CXCL14	?	Mono / L _B / NK
CC-	MCP-1	CCL2	CCR2	Mono / L _T / NK/ eosino Ψ
	MCP-4	CCL13		
	MCP-3	CCL7		
	MCP-2	CCL8	CCR5	Mono/Macro/ NK/ LT _{eff} / DC
	MIP-1 β	CCL4		
	MIP-1 α	CCL3	CCR11	Mono
	RANTES	CCL5		
	MIP-3	CCL23	CCR1	LT _{eff} /NK
	HCC-1	CCL14		
	HCC-2	CCL15	CCR3	eosino Ψ / Baso Ψ / DC _{imm} / NK
	HCC-4	CCL16		
	Eotaxin-1	CCL11		
	Eotaxin-2	CCL24	CCR4	DC / LT _{eff}
	Eotaxin-3	CCL28		
	TARC	CCL17	CCR6	DC _{imm} / LT _{eff} / L _B
	MCD	CCL22		
	MIP-3 α	CCL20	CCR7	DC/ Macro/ L _T
	MIP-3 β	CCL19		
	SLC	CCL21	CCR8	Mono/ L _T / DC _{imm}
	I-309	CCL1		
	TECK	CCL25	CCR9	L _B
	CTACK	CCL27		
	DC-CKI	CCL18	?	LT _{eff} / DC
C-	MCD	XCL1	CXCR1	L _B / L _T /NK/ Neutro Ψ
	MIP-3 α	XCL2		
CX3C-	Fractalkine	CX3CL1	CX3CR1	L _T /NK/ Neutro Ψ

Tableau 2.1 : Classification des chimiokines et de leurs récepteurs.

La majorité des chimiokines sont dites « inflammatoires » (rouge) c'est-à-dire inductibles dans des conditions inflammatoires. D'autres sont homéostatiques, exprimées de manière constitutives (noir). Cette distinction inductible/constitutive n'est toutefois pas absolue, certaines chimiokines appartiennent aux deux catégories (vert).

Abréviations : Neutro Ψ \rightarrow neutrophile / LT_{eff} \rightarrow Lymphocyte T effecteur / NK \rightarrow Natural Killer / Mono \rightarrow monocyte / L_B \rightarrow Lymphocyte B / DC \rightarrow cellule dendritique mature/ DC_{imm} \rightarrow cellule dendritique immature/ LTact \rightarrow Lymphocyte T activé / L_T \rightarrow Lymphocyte T / eosino Ψ \rightarrow eosinophile/ Baso Ψ \rightarrow basophile/Macro \rightarrow macrophage.

Les CC-chimiokines sont associées à des inflammations chroniques caractérisées par l'infiltration de monocytes, lymphocytes, éosinophiles, mastocytes et basophiles. Ces chimiokines induisent également une migration des Natural Killer (NK) et des cellules dendritiques (DC).

A.1.3 – Les CX3C-chimiokines

Ce troisième groupe de chimiokine, ne comporte à ce jour qu'un seul membre : le CX3CL1 dont les deux cystéines sont séparées par trois résidus. Le CX3CL1 également appelé fractalkine, est une chimiokine qui se distingue des autres chimiokines par sa structure particulière puisqu'elle possède un domaine hydrophile extracellulaire de 77 aa et un domaine hydrophobe de 18 aa qui lui permet un ancrage à la membrane, faisant d'elle la seconde chimiokine membranaire connue, avec le CXCL16. Sous sa forme membranaire, le CX3CL1 agit comme une molécule d'adhésion à part entière, responsable d'une forte adhérence leucocytaire, indépendante des intégrines. Le domaine extracellulaire peut être clivé donnant naissance à une chimiokine soluble chimio-attractante envers les monocytes, les lymphocytes T et les neutrophiles. Le chapitre III sera consacré à la description de CX3CL1 et son récepteur le CX3CR1, couple chimiokine/récepteur utilisé comme modèle au cours de mon travail de thèse.

A.1.4 – Les C-chimiokines

Encore appelées Lymphotactines (Ltn), les C-chimiokines ne possèdent que deux cystéines conservées et donc ne comportent qu'un seul pont disulfure. Le groupe n'est composé que de deux membres, XCL1 (Ltn- α) et XCL2 (Ltn- β). Leurs séquences sont très proches et ne diffèrent que par la nature des résidus 7 et 8 de l'extrémité N-terminale. Leurs gènes sont localisés sur le chromosome 1, région q23. Elles sont produites par les lymphocytes T8 activés du thymus et du sang périphérique. Ces deux chimiokines présentent une activité chimiotactique pour les lymphocytes via un unique récepteur le XCR1, hautement exprimé dans la rate, le thymus et l'intestin.

A.2 – Structure des chimiokines

A.2.1 – Séquence primaire

Bien que présentant une structure commune, les chimiokines ne se caractérisent pas par une homologie de séquence (20-80% de variation), ni par une homologie protéiques (20-30% de variation) entre les membres des quatre sous-familles. Toutefois au sein d'une même sous-

famille, cette variation s'amoindrit, ainsi les membres de la sous-famille CC- présentent une homologie protéique de 70% et ceux de la sous-famille CXC- montent jusqu'à 90% d'homologie protéique. Les chimiokines sont caractérisées par la présence d'un motif structural N-terminal commun, incluant deux ou 4 cystéines conservées. Ces cystéines, comme nous venons de la décrire sont à l'origine de la classification des chimiokines en quatre sous-familles (§ A.1). Elles sont engagées dans la formation de deux ponts disulfures, sauf pour les lymphotactines (XC-chimiokines) qui n'en possèdent qu'un.

A.2.2 – Structure tridimensionnelle

Les structures tridimensionnelles de plusieurs chimiokines ont été résolues par cristallographie aux rayons X et/ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) et montrent un repliement caractéristique. Cette topologie conformationnelle se caractérise par (Figure II-3A) :

- Une région N-terminale flexible, structurellement désordonnée qui précède la première cystéine.
- Un domaine très stable avec les deux premières cystéines engagées dans les ponts disulfures
- Une région en boucle appelée « N-loop »
- Un feuillet constitué de trois brins antiparallèles β reliés entre eux par les boucles 30s, 40s et 50s. En plus de ce rôle de connecteur des feuillets β , la boucle 30s et 50s contiennent les deux dernières cystéines engagées dans les ponts disulfures. L'ensemble forme un motif en clé grecque
- Un domaine C-terminal organisé en une hélice α et qui suit la dernière cystéine.

La stabilité de cette structure est assurée à la fois par les ponts disulfures mais également par des liaisons hydrophobes entre les résidus du domaine C-terminale et des résidus du feuillet β .

La portion N-terminale et la « N-loop » sont les deux sites majeurs d'interaction des chimiokines avec leurs récepteurs (Clark-Lewis, Kim et al. 1995; Clore and Gronenborn 1995; Baggiolini and Loetscher 2000).

A.2.3 – Structure quaternaire

C'est sous la forme de monomère que la plupart des chimiokines ont une activité biologique *in vitro* (Paolini, Willard et al. 1994). Cependant, les chimiokines ont la capacité de s'oligomériser à forte concentration.

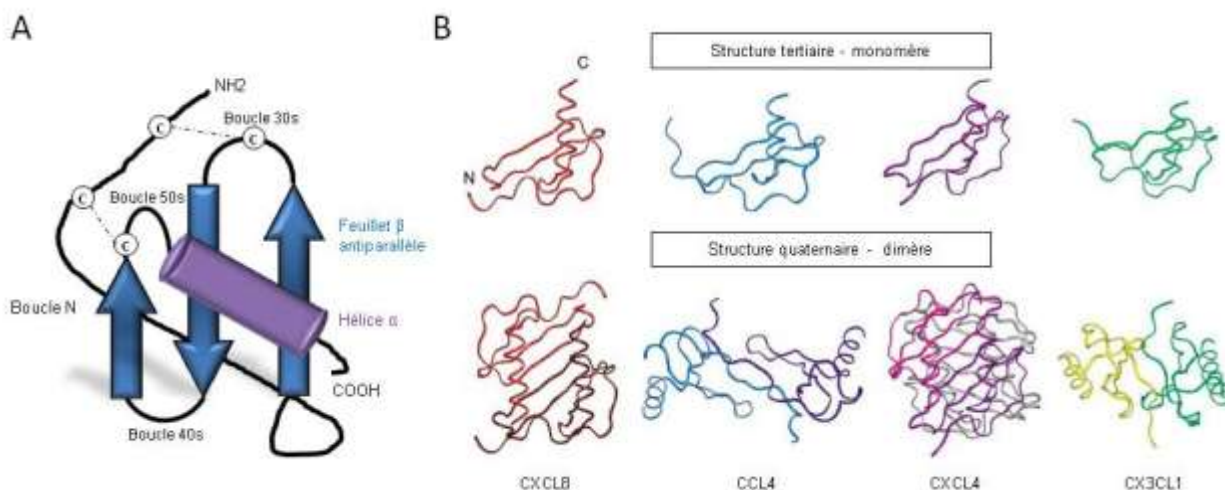


Figure II-3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des chimiokines

A- Structure 3D générale d'une chimiokine

B- Structure tertiaire et quaternaire de certaines chimiokines

La topologie générale monomérique est conservée entre les différentes sous-familles. Cependant, les structures de chimiokines résolues jusqu'ici, montrent que les dimères des différentes sous-familles adoptent des structures quaternaires très différentes (Figure II-3B). Les différences de dimérisation observées pour chaque sous-famille sont attribuées à des différences isoélectriques.

Les CXC-chimiokines ayant plus de résidus hydrophobes dans le premier feuillet β que les CC-chimiokines, dimérisent en utilisant ce premier feuillet comme interface inter-monomère, diminuant ainsi l'exposition des résidus apolaires à un environnement aqueux.

La question du caractère physiologique et du rôle éventuel de l'oligomérisation des chimiokines a fait l'objet de nombreux travaux. Il a ainsi été montré que les chimiokines conservent leur activité biologique qu'elle soit sous forme d'un dimère covalent ou d'un monomère (Rajaratnam, Sykes et al. 1994; Leong, Lowman et al. 1997). Il semble également que la dimérisation ne soit pas nécessaire à la fixation de la chimiokine à son récepteur et que plus globalement l'activité in vitro de la plupart des chimiokines ne nécessite pas cette dimérisation. Par contre, à forte concentration, CCL5 formerait des dimères qui seraient nécessaire pour son activité in vivo (Johnson, Kosco-Vilbois et al. 2004). De même, un variant monomérique de CCL2 conserve ses propriétés in vitro mais perd son pouvoir de recrutement cellulaire et acquiert des propriétés anti-inflammatoire in vivo (Handel, Johnson et al. 2008). Ces observations indiquent que la dimérisation de certaines chimiokines peut être déterminante pour leurs fonctions. A l'inverse, la dimérisation peut être associée à la perte des propriétés des monomères, comme c'est le cas pour CXCL12, qui serait cardio-protecteur uniquement sous

forme monomérique (Veldkamp, Seibert et al. 2006). Notons que certaines chimiokines, comme CCL1 ou CCL7 s'avèrent être incapables de former des dimères. La question du rôle fonctionnel de la dimérisation dépend donc de la chimiokine envisagée.

A.2.4 – Fixation aux glycosaminoglycanes

Bien que les chimiokines soient solubles, leur diffusion dans le tissu interstitiel est limitée par des interactions complexes avec les macromolécules de la matrice extracellulaire ainsi qu'avec les glycosaminoglycanes (GAG) de la surface des cellules (Figure II-4).

Les GAG sont des polysaccharides constitués d'une répétition de disaccharides variant tant en composition qu'en nombre et présentent à ce titre une très large diversité parmi les macromolécules biologiques. On les trouve sous forme soluble, comme c'est le cas pour l'héparine ou lié à la membrane sous la forme de protéoglycanes, dont l'exemple le plus répandue est l'héparane sulfate. Leur densité en groupements sulfate et carboxylate leur donne une charge globalement négative qui suggère une interaction électrostatique avec des protéines basiques. Les GAG peuvent donc interagir avec des centaines de protéines dont les chimiokines (Witt and Lander 1994).

L'interaction des chimiokines avec les GAG présents à la surface des cellules endothéliales permet la présentation des chimiokines aux cellules circulantes du sang, ce qui induit une adhésion leucocytaire solide. De plus il semble que la liaison aux GAG soit nécessaire au maintien du gradient de concentration des chimiokines à partir du site inflammatoire, ce qui permet la migration dirigée des cellules (Rot 1992). Toutefois plusieurs hypothèses, non exclusives, sont envisagées quant au rôle fonctionnel de cette liaison chimiokine-GAG :

- Un rôle protecteur des chimiokines contre leur dégradation (Kuschert, Coulin et al. 1999)
- Cela confère une orientation ou une conformation favorisant la liaison chimiokine / récepteur (Ali, Palmer et al. 2000)
- Il s'agit d'un élément combinatoire supplémentaire pour la spécificité des chimiokines : un récepteur serait ainsi spécifique d'une chimiokine donnée, liée à un GAG particulier (Witt and Lander 1994; Kuschert, Coulin et al. 1999; Vives, Crublet et al. 2004)
- Les GAG pourraient enfin favoriser l'oligomérisation des chimiokines.

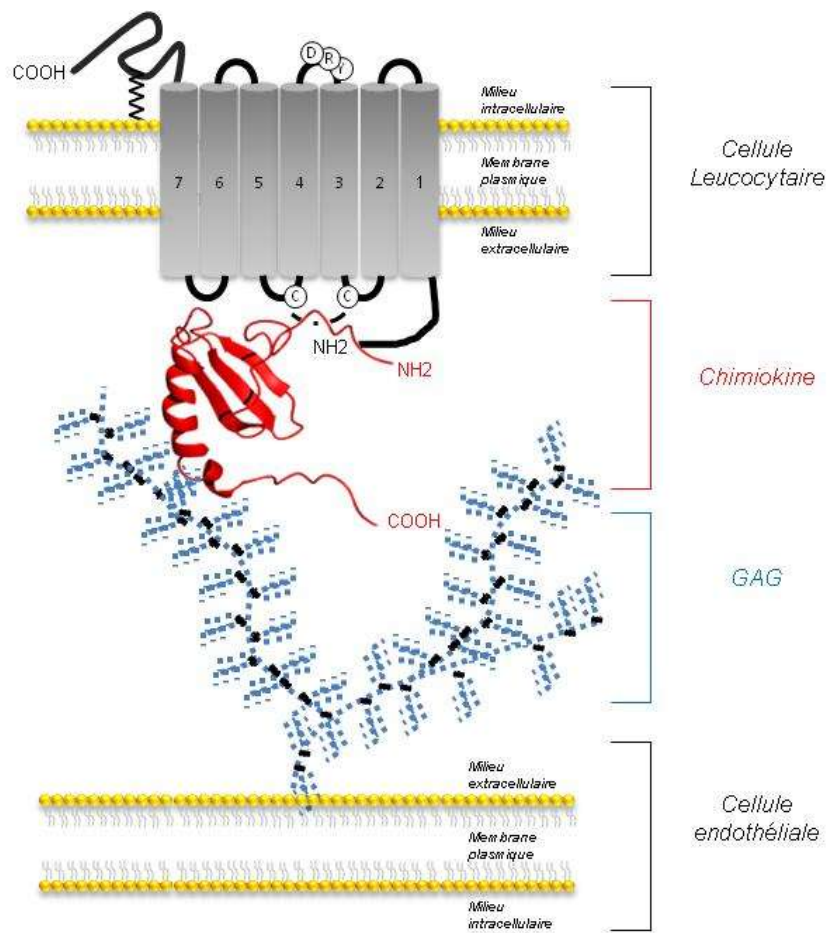


Figure II-4 : Interaction des chimiokines avec les glycosaminoglycans (GAG) et leurs récepteurs.

Les chimiokines sont présentées à la surface des cellules endothéliales grâce à leur interaction avec les GAG via leurs extrémités C-terminale. L'interaction avec le récepteur mobilise de nombreuses régions de la chimiokine, dont l'extrémité N-terminale.

B] Les Récepteurs aux Chimiokines (ou RCK)

B.1 – Classification des RCK

Les chimiokines exercent leur activité biologique en se liant à des récepteurs membranaires dont la particularité est de posséder sept domaines transmembranaires et d'être des RCPG. Une vingtaine de ces récepteurs ont été identifiés et répertoriés selon la même nomenclature que celle retenue pour leur ligand. Ainsi, les récepteurs aux chimiokine (RCK) sont répartis en quatre sous-familles dont la nomenclature fait écho à celle des quatre sous-familles de chimiokine : CCR (11 membres), CXCR (7 membres), XCR1 et le CX3CR1. A part quelques exceptions, un RCK ne peut lier que des chimiokines appartenant à la même famille. Pour exemple, le groupe des récepteurs appelé CXCR se lie et est activé par les CXC-

chimiokines, alors que les récepteurs CCR ne lient que des chimiokines de type CC-chimiokines (Tableau 2.1).

B.2 – Structure des RCK

Les vingt RCK connus appartiennent à la famille A2 des RCPG. Les analyses de séquence de ces récepteurs mettent en évidence un haut degré d'homologie au niveau des régions transmembranaires mais de grandes variations au niveau des domaines extramembranaires. Les parties les plus variables sont les régions N- et C-terminales, qui participent l'une à la liaison du ligand et l'autre à l'activation des partenaires intracellulaires (*protéine G*, *β -arrestines*, ...).

A l'inverse des chimiokines, seule la structure tridimensionnelle du CXCR4 et du CXCR1 ont été décrites et publiées (Wu, Chien et al. 2010), ce qui est principalement dû aux difficultés rencontrées lors de la cristallisation d'une protéine membranaire. Par extrapolation des structures tridimensionnelles des RCPG connues et en particulier du cristal du CXCR4, nous pouvons inférer que les RCK possèdent les caractéristiques communes suivantes :

- Une séquence primaire de longueur comprise entre 320 et 380 aa
- Une petite séquence N-terminale d'environ 40 aa
- Une extrémité C-terminale intracellulaire comprenant dans sa séquence plusieurs résidus sérine et thréonine qui sont hautement phosphorylables et impliquées dans la signalisation et la désensibilisation du récepteur
- Un motif DRY spécifique à cette famille de RCPG
- Une boucle ICL3 basique, très courte (12-14 aa) par rapport aux autres RCPG où cette boucle est constituée de 50 à 75 aa. Cette boucle est impliquée dans la sélectivité pour la protéine G
- La présence de deux ponts disulfure extracellulaires permettant le maintien de la structure tertiaire

Les RCK possèdent aussi des sites de maturation post-traductionnelle. On trouve principalement au niveau du domaine N-terminal, des sites de sulfatation sur les résidus thréonine et tyrosine ainsi que des sites N- et O-glycosylation. Ces modifications améliorent l'affinité des récepteurs pour le ligand (Bannert, Craig et al. 2001; Veldkamp, Seibert et al. 2006). Le domaine C-terminal des RCK, comme celui de tous les RCPG de famille I, contient des sites de palmitoylation. Ces sites semblent impliqués dans le trafic intracellulaire et l'expression des récepteurs en surface (Blanpain, Wittamer et al. 2001; Percherancier, Planchenault et al. 2001).

B.3 –Dimérisation et Oligomérisation des RCK

Sur la vingtaine de RCK actuellement connus, environ un tiers sont décrits comme pouvant former des homo et / ou hétérodimères entre eux (**Tableau 2.2**). Qu'ils soient constitutifs ou conséquent à une activation par le ligand reste encore un point controversé. Considérons ici l'exemple du CXCR4 dont l'existence d'un dimère a été confirmée par plusieurs techniques. Vila-Coro *et al.* montrent que suite à l'immunoprécipitation de CXCR4, seules les cellules

ayant été stimulées avec du SDF présentent des bandes immunoréactives à 80kDa, le poids moléculaire approximatif d'un dimère de CXCR4 (Vila-Coro, Rodriguez-Frade *et al.* 1999). Dans une autre étude menée en FRET cette fois, Toth *et al.* constatent un transfert d'énergie basal entre CXCR4-CFP et CXCR4-YFP et une augmentation de signal après stimulation par le SDF; ils en concluent que la dimérisation de CXCR4 préexiste à la stimulation mais est renforcée voir augmenter par le ligand (Toth, Ren *et al.* 2004). Par contre, plusieurs travaux démontrent que la dimérisation de CXCR4 est constitutive (Percherancier, Berchiche *et al.* 2005) (Wang, He *et al.* 2006). On est donc en présence de tous les cas de figures possibles : inductible, constitutif ou inductible et consécutif à la fois. La même controverse existe pour le CCR5 (Hernanz-Falcon, Rodriguez-Frade *et al.* 2004; Rodriguez-Frade, del Real *et al.* 2004; Lemay, Marullo *et al.* 2005).

En plus d'une homodimérisation, le CXCR4 peut s'hétérodimériser avec plusieurs autres RCK. Par exemple dans les lymphocytes T, le CXCR4 s'hétérodimérise avec CCR5. Contrairement aux récepteurs individuels, couplés uniquement à une G_i , l'hétérodimère CXCR4/CCR5 peut se coupler à G_q et /ou G_{11} , ce qui conduit à augmenter l'activation des cellules T (Molon, Gri *et al.* 2005; Contento, Molon *et al.* 2008). CXCR4 peut également former un hétérodimère avec CXCR7, un récepteur qui a la particularité de lier le même ligand, SDF-1. Cet hétérodimère constitutif a été révélé en FRET et en co-immunoprécipitation et potentialiserait la réponse calcique de CXCR4 (Sierro, Biben *et al.* 2007).

En dehors de toute controverse sur l'origine des homo- et hétéro- dimères de RCK, il reste à savoir si leur formation est transitoire comme cela a été montré pour nombreux RCPG de classe A (Prinster, Hague *et al.* 2005; Kasai and Kusumi 2014) ou si elle est permanente comme pour les RCPG de classe C et comme le laisse penser les données de cristallisation de CXCR4 (Wu, Chien *et al.* 2010)

Dimère	Méthode d'étude	Références
CCR2 – CCR2 (Homo-dimère)	BRET, Co-IP	El-Asmar et al. 2005 Percherancier et al, 2005
CCR2 – CCR5 (Hétéro-dimère)	BRET, Co-IP, radiolisation	El-Asmar et al. 2005
CCR2 – CXCR4 (Hétéro-dimère)	BRET, radiolisation	Percherancier et al. 2005 Sohy et al. 2007
CXCR4 – CXCR4 (Homo-dimère)	BRET, FRET	Babcock et al. 2003; Percherancier et al.2005
CCR5 – CCR5 (Homo-dimère)	BRET, FRET, Co-IP	El-Asmar et al. 2005 Hernanz-Falcon et al.2004 Issafras et al. 2002
CXCR1 – CXCR1 (Homo-dimère)	BRET, FRET, Co-IP	Wilson et al. 2005
CXCR1 – CXCR2 (Hétéro-dimère)	BRET, FRET, Co-IP	Wilson et al. 2005
CXCR2 - CXCR2 (Homo-dimère)	BRET, FRET, Co-IP	Trettel et al. 2003 Wilson et al. 2005
CXCR7 -CXCR7 (Homo-dimère)	BRET	Kalatskaya et al. 2009
CXCR4 - CXCR7 (Hétéro-dimère)	FRET	Sierro et al. 2007
CXCR4 - CCR5 (Hétéro-dimère)	BRET	Contento et al. 2008
CX3CR1 – CX3CR1 (Homo-dimère)	BRET	Darbandi-Tehrani et al. 2010

Tableau 2.2 : Homo- et Hétéro- dimères de RCK connus

B.4 –Expression des RCK

L'obtention d'anticorps spécifiques aux différents RCK a permis d'étudier finement l'expression de ces récepteurs à la surface des leucocytes et de comparer leur expression dans les situations physiologiques et pathologiques

B.4.1 – Profil d'expression des RCK

Les RCK sont exprimés à la surface d'une multitude de type cellulaire (**Figure II-5**) dont les cellules épithéliales et endothéliales (Bernardini, Ribatti et al. 2003), les cellules musculaires lisses (CML) (Reape and Groot 1999) ou encore au sein du système nerveux : sur les neurones et les cellules microgliales (Rollins 1997). Leur présence à la surface de ces types cellulaires, non circulants, les prédispose à des fonctions dépassant leur statut de simple partenaire chimio-attractant. Toutefois, les RCK sont principalement exprimés sur les leucocytes.

Chaque classe de leucocyte présente un profil différentiel d'expression de RCK, par leur combinaison et leur niveau d'expression. Alors que certains récepteurs sont exprimés sur plusieurs classes de leucocytes, d'autres sont plus spécifiques : par exemple le CCR5 pour les monocytes, le CCR3 à la surface des éosinophiles ou encore le CXCR1 et le CXCR2 exclusivement exprimés à la surface des neutrophiles. Les lymphocytes expriment eux la quasi-totalité du répertoire RCK (Loetscher, Moser et al. 2000). Néanmoins le profil d'expression dans cette population est variable en fonction de l'état de maturation et d'activation. Par exemple, les cellules dendritiques immatures expriment le CCR1, CCR2 et CCR5 alors que les formes matures expriment le CCR4 et CCR7, ces derniers permettant la migration dans les organes lymphoïdes secondaires (Sallusto and Lanzavecchia 2000) (**Tableau 2.1**). Les RCK constituent des marqueurs des différentes classes de T (*Th1/Th2/Th17/Th23...*).

B.4.2 – Régulation de l'expression des RCK

L'expression des RCK est stimulée par certaines cytokines, comme par exemple l'Interleukine-2 qui stimule l'expression de CCR1, CCR2, CCR5, CXCR4 et CX3CR1 à la surface des Lymphocytes T (Loetscher, Seitz et al. 1996) tandis que le TGF- β (**T**ransforming **G**rowth **F**actor **β**) modifie le profil d'expression des RCK présents à la surface des cellules dendritiques (DC) (Sato, Kawasaki et al. 2000).

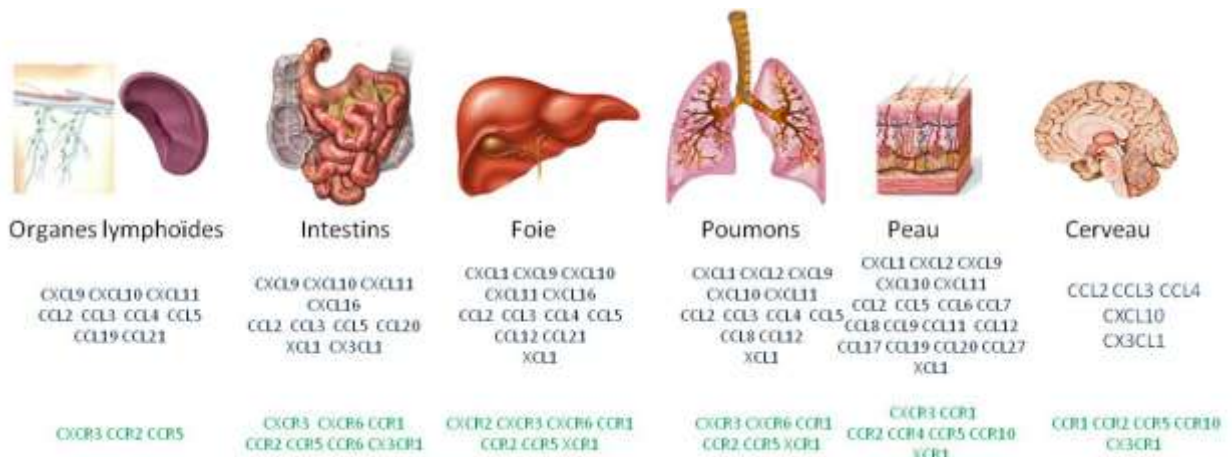


Figure II-5 : Expression des chimiokines et de leurs récepteurs au sein des différents organes

L'expression des RCK est également régulée par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ qui augmente l'expression de CXCR3 sur les lymphocytes T activés et de CCR1 et CCR3 sur les neutrophiles mais qui diminue l'expression de CCR1, CCR3, CCR5, CCR6 et CXCR4 sur les cellules dendritiques matures.

En conclusion, l'expression des RCK sur les leucocytes dépend du type cellulaire, du stade de différenciation et de l'état d'activation de la cellule. Le système chimiokinergique est donc finement régulé et adapté en fonction des différentes populations cellulaires, de leur localisation et de leur état d'inactivation.

C] Interaction Chimiokine-Récepteur

L'affinité des chimiokines pour leur récepteur est de l'ordre du nanomolaire. Elle varie en fonction de plusieurs paramètres dont le couple récepteur-chimiokine étudié (Kohout, Nicholas et al. 2004), le type cellulaire (Locati, Riboldi et al. 2001) ou encore la présence de GAG (Appay, Brown et al. 1999).

C.1 – Redondance des interactions ligands/récepteurs

La redondance tient du fait qu'une chimiokine peut être le ligand de plusieurs récepteurs, à des degrés d'affinité variable et que plusieurs récepteurs peuvent partager le même ligand (**Tableau 2.1**). Cette redondance importante a pour conséquence directe de stabiliser l'ensemble du système chimiokinergique, tout en compliquant l'étude de ces interactions multiples. Elle entretient aussi la robustesse et l'adaptabilité de la réponse inflammatoire et immune qui obéit ainsi à un réseau protéique et non à un élément unique. Nous pouvons

cependant remarquer que certains systèmes de chimiokines dérogent à la cette règle, à l'instar du couple CX3CL1/CX3CR1.

C.2– Un modèle d'interaction en deux étapes

Les études de relations structure-activité suggèrent un modèle d'interaction chimiokine/récepteur en deux étapes, qui a été étudié dans les cas du couple CCR5/CCL5 (Nikolaev and Lohse 2006) et CXCR4/CXCL12 (Clark-Lewis, Kim et al. 1995). Au cours d'une première étape, la chimiokine reconnaît, via son extrémité N-terminale, l'extrémité N-terminale du récepteur (**Figure II-6**). Les boucles extracellulaires du récepteur, contenant des résidus chargés, vont ensuite interagir à leur tour avec la partie N-terminale de la chimiokine. Cette étape conduit au changement conformationnel du récepteur correspondant à son activation et au déclenchement d'une signalisation. Ainsi selon ce modèle, la chimiokine interagit avec son récepteur via deux sites, tous deux relativement courts (quelques aa seulement) mais relativement proches dans l'espace. Toujours conformément à ce modèle, c'est la séquence de l'extrémité N-terminale du RCK qui détermine la spécificité de liaison de ses ligands.

C.3– Transduction du signal

La fixation d'une chimiokine à son récepteur provoque une cascade d'événements intracellulaires aboutissant à différents effets biologiques.

La majorité des voies de signalisation en aval des RCK font intervenir les protéines G. Néanmoins, il existe une grande diversité des signaux intracellulaires qui ne semblent pas se limiter aux seules voies de signalisation G dépendantes. Plusieurs de ces voies pouvant s'activer parallèlement (**Figure II-7**). Ainsi la complexité du réseau extracellulaire des chimiokines et de leurs récepteurs, semble être doublée d'une complexité intracellulaire liée à la combinatoire des signaux intracellulaires.

C.3.1 – Voies protéine G dépendantes

Il est admis de façon générale que les RCK sont couplés à une protéine G hétérotrimérique de la famille $G_{i/o}$, sensible à la PTX (Thelen 2001). Selon ce couplage, il est classique d'observer une inhibition de l'AC, aboutissant à une réduction du niveau d'AMPc intracellulaire responsable de l'activation entre autre de la PKA (Murphy, Baggiolini et al. 2000; Bajetto, Barbero et al. 2001).

Parallèlement à cette voie de signalisation AMPc, la majorité des chimiokines activent la voie de la PLC. Cette voie de signalisation peut passer soit par la protéine $G\alpha_i$ soit par le

complexe $\beta\gamma$ (Neptune and Bourne 1997). Les PKA et PKC catalysent la phosphorylation de nombreuses protéines cibles dont les MAPK. Les principaux membres des MAPK sont les kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et la protéine p38, décrites comme d'importants régulateurs du chimiotactisme (Klemke, Cai et al. 1997). Cependant, les MAPK peuvent être activées par une voie alterne, impliquant Ras et Raf (Knall, Young et al. 1996).

Enfin, le dimère $\beta\gamma$ semble jouer un rôle important dans la signalisation des RCK, grâce à l'activation de la voie de la PI3K et de son effecteur la protéine Kinase B (PKB) (Ganju, Brubaker et al. 1998). Cette voie semble être impliquée dans le processus inflammatoire (Ward, Sotsios et al. 2003) et la limitation de la septicémie (Martin, Souza et al. 2010). Il a également été rapporté que le recrutement leucocytaire est affecté en absence de PI3K, suggérant son rôle clé dans la signalisation des RCK et des fonctions cellulaires qui en découlent (Hirsch, Katanaev et al. 2000; Hannigan, Zhan et al. 2002).

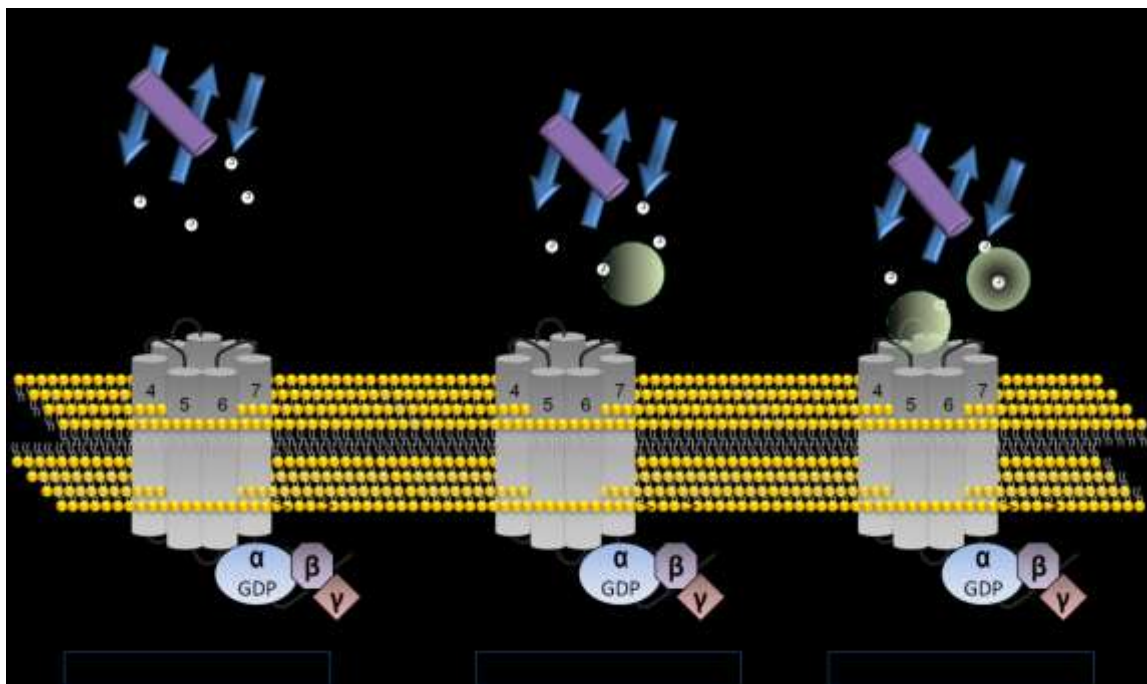


Figure II-6 : Interaction en deux étapes des chimiokines avec leur récepteur.

La phase de rapprochement des chimiokines de leurs récepteurs est dirigée par des forces électrostatiques entre la charge négative des boucles extracellulaires du récepteur et la surface positivement chargée de la chimiokine. La première phase d'interaction implique les extrémités N-terminales des deux partenaires. Cette première interaction, induit un changement conformationnel du récepteur permettant une interaction de la chimiokine, toujours par son extrémité N-terminale, avec les boucles extracellulaires du récepteur.

En outre, les signaux induits par l'activation de la protéine G conduisent à une polymérisation de l'actine, à une régulation positive des molécules d'adhérence et à d'une multitude d'autres composants cellulaires permettant la migration cellulaire. De plus, d'autres fonctions leucocytaires, comme la dégranulation ou la prolifération, sont activées par les cascades de signalisation induites par les RCK (Rowland-Jones, Pinheiro et al. 2001).

Par ailleurs, il a été décrit un couplage différentiel des RCK avec non pas une $G_{i/o}$ mais avec des G_{14} ou G_{15} de la famille des G_q comme c'est le cas du CXCR3 ou encore du CXCR4 (Shi, Partida-Sanchez et al. 2007; Kumar, Kremer et al. 2011).

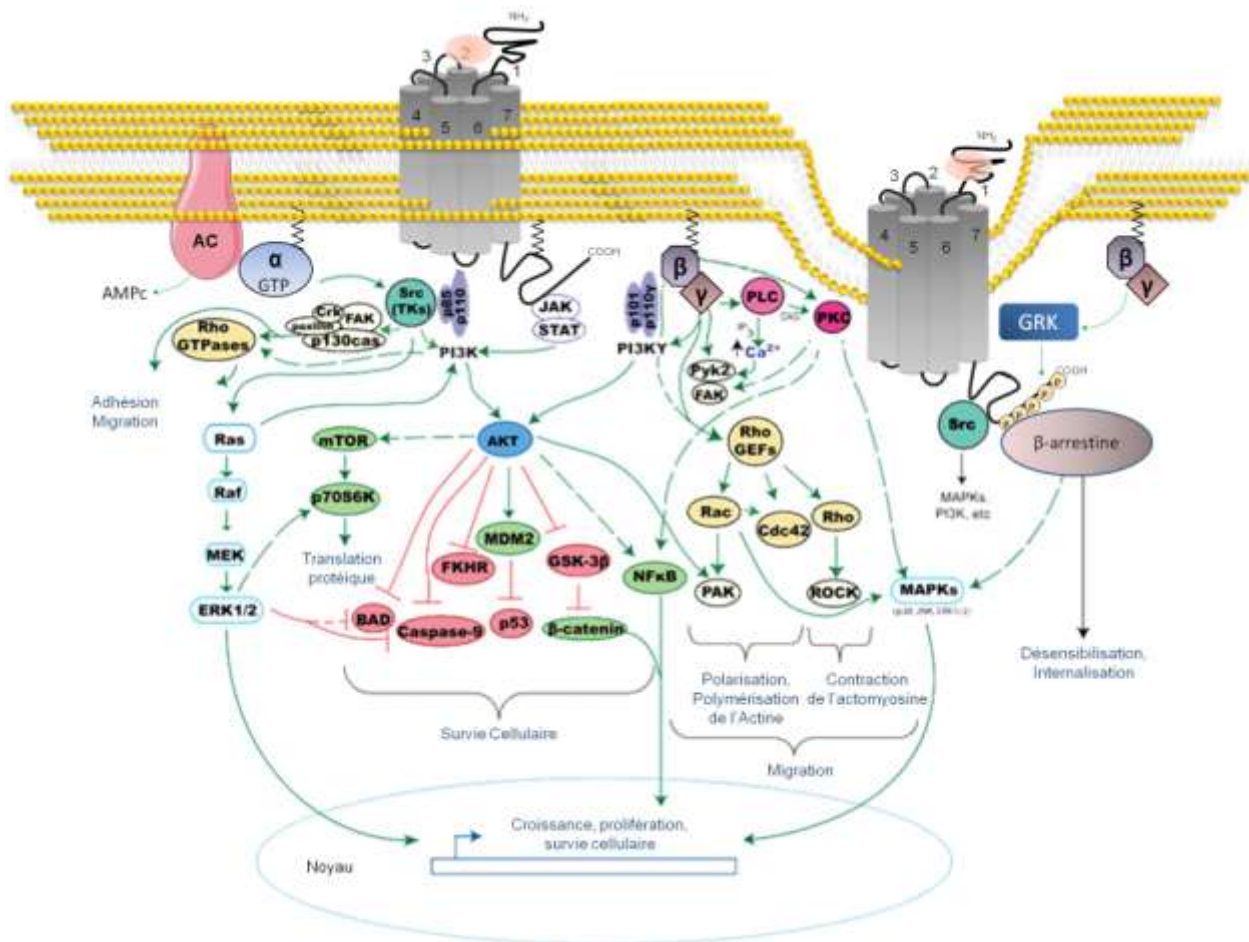


Figure II-7: Complexité des voies de signalisation induite suite à l'activation d'un RCK (adaptée à partir O'Hayre et al. 2008)

C.3.2 – Voies protéine G indépendantes

D'autres voies de signalisation insensibles à la PTX et indépendantes des protéines G_i , ont été mises en évidence en aval des RCK (Arai and Charo 1996). Ces voies impliquent JAK/STAT (**J**anus **K**inase / **S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription) (Rodriguez-

Frade, Mellado et al. 2001), ERK (Kumar, Tripathi et al. 2012) ou font intervenir les β -arrestines (Kraft, Olbrich et al. 2001; Fong, Premont et al. 2002; Sun, Cheng et al. 2002). Ces résultats restent cependant très controversés (Ahr, Denizot et al. 2005; Moriguchi, Hissong et al. 2005)

C.3.3 – Régulation de l'activité

Désensibilisation

L'arrêt du signal en aval des RCK suit la même logique que celle décrite pour l'ensemble des RCPG au cours du chapitre I et que je rappelle brièvement ici : l'activation du RCK par un agoniste induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Cette régulation dite « négative » permet un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Il s'agit du premier maillon de la chaîne de verrouillage de la transduction du signal. Le récepteur désensibilisé, bien qu'encore à la surface, est incapable de générer une signalisation car il a perdu sa capacité à lier une protéine G. La phosphorylation du récepteur et la fixation de la β -arrestine au niveau de la partie C-terminale sont à l'origine de cette perte de liaison Récepteur- Protéine G. Des mécanismes de désensibilisation croisée entre RCK ont été rapportés (Richardson, Pridgen et al. 1998). La phosphorylation peut être induite par trois protéines kinases différentes :

- PKA ou PKC, activées par les seconds messagers (*AMPc, calcium et DAG*).
- les GRK.

Concrètement, cette phosphorylation se traduit par le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine cytosolique, la β -arrestine, qui empêche la liaison de la protéine G sur le récepteur et initie la seconde phase d'arrêt du signal : l'internalisation.

Internalisation

Une fois à la membrane, la β -arrestine devient alors un partenaire essentiel de la machinerie d'endocytose en permettant la formation des puits recouverts de clathrine, indispensables à l'internalisation du récepteur.

Néanmoins des études suggèrent que le trafic et la signalisation de certains RCK sont régulés par une voie indépendante de la clathrine (Rose, Foley et al. 2004). Cette voie impliquerait des radeaux lipidiques ou plus globalement des structures riches en cholestérol appelées cavéoles, c'est le cas du récepteurs CXCR4. L'équilibre entre les voies

d'internalisation par la clathrine ou par les cavéoles dépend du type cellulaire étudié (Venkatesan, Rose et al. 2003) vs (Signoret, Hewlett et al. 2005).

En outre, un ligand peut avoir une meilleure efficacité d'internalisation d'un récepteur activé qu'un autre ligand du même récepteur. Ainsi, par exemple, CXCL8 est plus efficace que CXCL6 pour induire l'internalisation de CXCR2 *in vitro* alors que l'affinité de liaison est comparable (Feniger-Barish, Belkin et al. 2000). De la même manière, CCL22 est supérieur à CCL17 dans sa capacité d'internalisation du CCR4 (Mariani, Lang et al. 2004)

Le récepteur une fois internalisé peut suivre deux voies : soit il est dirigé vers des endosomes de recyclage, soit il est orienté vers le compartiment lysosomal. Le pH acide des endosomes de recyclage peut favoriser la dissociation entre le ligand et le récepteur.

Resensibilisation

Une fois le récepteur « vidé » de son ligand, il peut reprendre sa conformation de repos, être déphosphorylé par des phosphatases spécifiques et être recyclé à la membrane plasmique : on parle de resensibilisation. Cette resensibilisation permet d'éviter une désensibilisation prolongée des récepteurs qui aboutirait à l'incapacité pour la cellule de répondre de manière appropriée à des signaux extracellulaires. En revanche, d'autres récepteurs sont dirigés vers les lysosomes où ils sont dégradés par des protéases.

D'autres paramètres comme la durée de la stimulation ou la concentration de ligands jouent un rôle dans la décision de recyclage ou de dégradation. Comme pour l'internalisation, des chimiokines différentes, liant un même récepteur avec la même affinité, peuvent réguler inégalement la dynamique du recyclage. Ainsi, la stimulation de CCR3 par CCL11 conduit à l'augmentation de la dégradation et à une désensibilisation prolongée du récepteur, en comparaison à la stimulation du même récepteur par CCL5 qui conduit à son recyclage (Zimmermann, Conkright et al. 1999).

DJ Rôles physiologiques des chimiokines et des RCK

Les chimiokines sont des acteurs chimiotactiques indispensables au recrutement des cellules circulantes au site de l'inflammation. Néanmoins leur spectre d'action ne se limite pas à cette fonction mais s'étend à des rôles de modulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de l'activation cellulaire. Ainsi les chimiokines et leurs récepteurs se retrouvent impliqués dans de nombreux processus biologiques. En plus de leur implication dans les mécanismes de défense de l'hôte (Sallusto and Lanzavecchia 2000; Rot and von Andrian 2004), les chimiokines jouent un rôle important dans l'embryogénèse (Raman, Sobolik-Delmaire et al.

2011), l'hématopoïèse (Broxmeyer 2008), la cicatrisation cutanée (Zaja-Milatovic and Richmond 2008) ou encore l'angiogenèse (Kiefer and Siekmann 2011). Par soucis de clarté, nous ne détaillerons au cours de ce chapitre que les rôles les plus généraux des chimiokines en physiologie et physiopathologie humaine (Figure II-8).

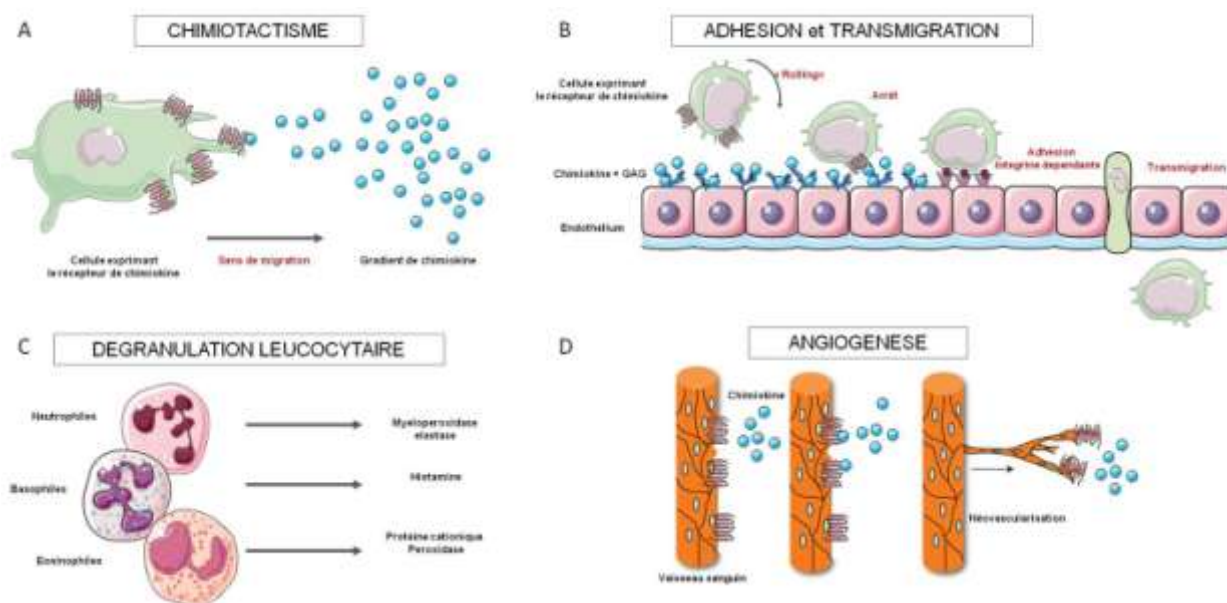


Figure II-8 : Illustration du rôle des chimiokines au cours de différents processus physiologiques

Migration leucocytaire en réponse à un gradient de chimiokine (A). Activation des intégrines suite à l'interaction des leucocytes exprimant les RCK avec les cellules endothéliales sécrétrices de chimiokines (B). Dégranulation des leucocytes et libération des médiateurs de l'inflammation suite à l'activation de leurs RCK (C). Illustration des propriétés angiogéniques et angiostatiques des chimiokines et de leurs RCK (D).

D.1 – Chimiotactisme et Migration cellulaire

Leur rôle chimio-attractant fait des chimiokines des molécules clés du système immunitaire qui orchestrent finement le trafic leucocytaire et leur recrutement vers le site de l'inflammation.

D.1.1. – Transmigration endothéliale

Lors d'une réaction inflammatoire, on assiste à un recrutement des leucocytes circulants vers le tissu en proie à l'inflammation. Ce recrutement des leucocytes à partir du sang vers le tissu inflammé nécessite le passage à travers la barrière endothéliale, on parle de transmigration endothéliale. Cette transmigration se produit selon une chronologie précise et est guidée par un gradient interstitiel de molécules chimiotactiques, dont les chimiokines.

On distingue 4 étapes successives (Granger and Kubes 1994; Springer 1994) (**Figure II-8**). Lors d'une première étape, on assiste à un ralentissement de certains leucocytes dont les microvillosités s'enchevêtrent dans celles des cellules endothéliales. Au cours de cette première étape, les liaisons engagées sont transitoires et réversibles, se traduisant surtout par un ralentissement des leucocytes puis un roulement dû aux forces hémodynamique de cisaillement du flux sanguin. Ces liaisons mobilisent essentiellement des sélectines comme principales molécules d'adhésion. Au niveau du site de l'inflammation, des chimiokines inflammatoires vont être secrétées par les cellules endothéliales. En interagissant avec leurs récepteurs présent à la surface des leucocytes, elles induisent, pour certaine comme le CCL2, une augmentation de la concentration d'intégrines à la surface des leucocytes, ce qui aura pour effet une adhérence ferme et stable du leucocyte à la surface de l'endothélium et une immobilisation totale. C'est l'étape d'arrêt. Enfin, on assiste à la traversée de l'endothélium ou diapédèse. Cette dernière étape semble être contrôlée par les ligands des intégrines PECAM (**P**latelet **E**ndothelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule), ICAM (**I**nter**C**ellular **A**dhesion **M**olecule) et VCAM (**V**ascular **C**ell **A**dhesion **M**olecule) exprimés à la surface des cellules leucocytaires.

D.1.2 – Migration interstitielle

Après avoir franchi la barrière endothéliale, les leucocytes poursuivent leur migration à travers le tissu vers le site de l'inflammation. Un gradient de concentration de chimiokines permet leur guidage. Ces chimiokines sont secrétées par des cellules immunes activées, présentes sur le site de l'inflammation. Ces molécules diffusent tout en se fixant à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des GAG, créant ainsi un gradient de concentration.

D.2 – Hématopoïèse

Les chimiokines interviennent déjà dans le processus de maturation des leucocytes alors qu'ils ne sont encore que des précurseurs hématopoïétiques contenus dans la moelle osseuse ou le thymus. En effet, les chimiokines sont de plus en plus reconnues comme régulateur de la différenciation, de la mobilisation et de la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse. On observe entre autre des profils d'expression des chimiokines et de leurs récepteurs variables en fonction du stade de maturation du leucocyte. Ces modulations sophistiquées permettent notamment une relocalisation des précurseurs au sein des différents compartiments tissulaires pendant les multiples phases de maturation.

D.3 – Angiogenèse

L'angiogenèse est, par définition, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de micro-vaisseaux préexistants. Il s'agit d'un processus biologique essentiel au développement physiologique (*organogenèse*, *embryogenèse*,...) mais aussi aux désordres pathologiques (*développement tumoral*). Ce processus se déroule en deux étapes : Premièrement, on assiste à une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire suivie deuxièmement d'une migration et prolifération de cellules endothéliales. La régulation de l'angiogenèse dépend d'un équilibre entre molécules angiogéniques et angiostatiques qui, respectivement, favorisent ou inhibent la néovascularisation.

La famille des chimiokines CXC- est la principale famille dont les membres régulent l'angiogenèse aussi bien dans le sens d'une stimulation que d'une inhibition. Les chimiokines agissent sur les deux étapes clés du processus d'angiogenèse (Belperio, Keane et al. 2000). En modulant la production de metalloprotéases, elles régulent l'étape de dégradation de la matrice extracellulaire (Park and Wells 2004) alors que leur propriété chimio-attractante leur permet d'intervenir au cours de la seconde étape, i.e. la migration des cellules endothéliales vers le site de néovascularisation.

L'activité angiogénique de cette famille de chimiokine CXC- semble être contrôlée par la présence, chez certains membres de la famille CXC-, du motif ELR (Karagiannis and Popel 2008). Ainsi les chimiokines CXC- contenant le motif ELR (ELR⁺), tel que le CXCL8 sont angiogéniques alors que les chimiokines CXC-ELR⁻ sont plutôt angiostatiques (Angiolillo, Sgadari et al. 1995; Strieter, Poverini et al. 1995; Sgadari, Farber et al. 1997). Toutefois cette classification n'est pas absolue. En effet, la chimiokine CXCL12 (ELR⁻) est chimio-attractante vis-à-vis des cellules endothéliales in vitro et présente des propriétés angiogéniques in vivo (Salcedo and Oppenheim 2003).

Quelques chimiokines autres que les CXC-chimiokines semblent être impliquées dans ce processus, c'est notamment le cas de CCL2, qui induit la migration des cellules endothéliales CCR2⁺ tout en stimulant la néovascularisation dans différents modèles (Salcedo, Ponce et al. 2000).

D.4 – Initiation de la réponse immunitaire...

Au vu de leur rôle capital dans l'orchestration des mouvements cellulaires, les chimiokines sont largement impliquées dans la mise en place d'une réponse immunitaire.

D.3.1 – ...innée

La capacité de l'organisme à répondre rapidement à un agent pathogène, externe ou interne, par la mise en place d'un mécanisme de défense non-spécifique constitue la première étape du processus de défense immunitaire qualifié d'innée. Elle repose sur la reconnaissance par les cellules immunitaires résidentes des tissus (*DC, macrophages ou mastocytes*) de signaux de danger ou de motifs pathogéniques (PAMP - **P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns). La reconnaissance de ces motifs PAMP est possible grâce à la présence de « Toll Like Receptor » (TLR) ou encore de « Nucleotide-Binding Site Leucine Rich Repeat protein » (NBS LRR) à la surface de ces cellules, qui s'en trouvent activées. En réponse à cette activation, elles libèrent dans le milieu extracellulaire de l'histamine et des cytokines pro-inflammatoires (*interleukines, TNF- α ou l'IFN- γ*) responsables d'une augmentation de la sécrétion des chimiokines. L'effet combiné de ces différentes molécules va permettre le recrutement de cellules circulantes, l'élimination du pathogène et la réparation de la lésion.

D.3.2 – ...adaptative

L'immunité adaptative s'ajoute à l'immunité innée et assure une action plus spécifique contre les agressions de l'organisme. Les principales cellules impliquées dans cette réponse sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes qui sont activés par la reconnaissance de l'antigène. Trois types de cellules ont constitutivement des propriétés de capture et de présentation de l'antigène : les DC, les macrophages et les lymphocytes B. Néanmoins, les DC sont les plus efficaces et constituent les principaux effecteurs de cette réponse immunitaire spécifique.

Les DC sentinelles sont dispersées dans la majorité des tissus et se trouvent dans un état immature. Elles expriment différents RCK tel que le CCR1/2/3/5/6 et CXCR1/2, ce qui les rend sensibles aux chimiokines et module leur recrutement sur le lieu de lésion où sont produites les chimiokines. Lors de la capture d'un antigène, ces cellules se différencient en DC matures. Cette différenciation s'accompagne d'une modulation de l'expression des RCK présents à la surface. On a ainsi une perte de l'expression des RCK inflammatoires au profit d'une augmentation de l'expression de CCR7, provoquant la migration des DC vers les vaisseaux lymphatiques afférents, où elles assurent leurs fonctions de présentatrice d'antigènes aux lymphocytes T naïfs (Tang and Cyster 1999).

Les chimiokines régulent le trafic lymphocytaire et la localisation des lymphocytes au sein de ces organes pendant la lymphopoïèse mais également lors des processus d'immunosurveillance ; CXCL12, CXCL13, CCL19 et CCL21 en sont des exemples. Certaines

de ces chimiokines semblent également être indispensables pour la formation de ces organes (Cyster 1999). L'entrée des lymphocytes naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, plaques de Peyer) a lieu via leur migration à travers les HEVs (**H**igh **E**ndothelial **V**enules). Les expériences *in vitro* montrent que les chimiokines exprimées à la surface des HEV sont requises pour l'adhérence des lymphocytes T à la surface de l'endothélium et participent activement à l'entrée ou extravasation des lymphocytes du compartiment sanguin vers les organes lymphoïdes secondaires. Une fois à l'intérieur des organes lymphoïdes, les lymphocytes T migrent vers les zones T par un processus qui requiert, d'une part, l'expression de CCR7 à la surface des lymphocytes T et, d'autre part, l'expression de CCL19 et CCL21 à l'intérieur des zones T par les cellules dendritiques et les macrophages (Cyster 2000).

Les chimiokines et leurs récepteurs permettent ainsi la régulation de la réponse immune innée comme adaptative (Campbell, Kim et al. 2003; Esche, Stellato et al. 2005) en intervenant non seulement sur le contrôle du recrutement des leucocytes (Friedl and Weigelin 2008) mais également sur leur activation et leurs fonctions effectrices (Rossi and Zlotnik 2000; Sallusto and Lanzavecchia 2000).

E] Physiopathologie des chimiokines et de leurs récepteurs

Du fait de leurs propriétés multiples et de leur importance dans de nombreux processus biologiques vitaux, un dérèglement ou un détournement du système chimiokine/RCK est souvent associé à différents états pathologiques. Ainsi différents couples chimiokine/RCK ont été impliqués dans diverses pathologies telles que l'asthme et l'allergie (Pease 2006), les maladies auto-immunes (Godessart and Kunkel 2001), l'athérosclérose (Poupel, Boissonnas et al. 2013; Wan and Murphy 2013), l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)(Evans, Khoury et al. 2012), la douleur (Gao and Ji 2010) ou encore dans le développement tumoral (Jacquelin, Licata et al. 2013). Nous détaillerons ici l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans trois types de pathologies inflammatoires, virales et tumorales, à l'aide d'un exemple représentatif de chacune.

E.1 – Chimiokines et maladies inflammatoires

Au vu des capacités des chimiokines à orchestrer la réponse immunitaire, il est relativement aisé de faire le lien entre ces pathologies « inflammatoires » et un dysfonctionnement du système des chimiokines. En effet, une sécrétion non-contrôlée de chimiokines peut être à l'origine de la perturbation du recrutement cellulaire. Une perte d'expression des RCK ou une diminution de la sécrétion des chimiokines ont également pour

conséquence la perte des capacités de recrutement des cellules immunitaires sur le site de lésion et donc perturbe la mise en place d'une réponse immunitaire efficace et appropriée.

Dans certains cas, on assiste à une infiltration leucocytaire au sein d'un tissu sain, suivie d'une production anormale de chimiokines : la réponse immunitaire est activée de manière non-appropriée au sein d'un tissu parfaitement sain. C'est le cas dans de nombreuses pathologies inflammatoires, tel que les rhumatismes, les réactions allergiques (*asthme, dermatite, rhinite allergique*), les pathologies auto-immunes comme la sclérose en plaque ou encore dans certaines pathologies cardiaques, la plus représentative étant l'athérosclérose.

Exemple de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie chronique inflammatoire des gros vaisseaux. L'évolution de cette maladie repose en partie sur une infiltration de leucocytes, principalement de type monocyttaire et lymphocytaire, au sein de la paroi inflammée. Ce recrutement cellulaire est étroitement associé à l'activité de plusieurs chimiokine et de leurs récepteurs. De nombreuses études rapportent le rôle central des chimiokines dès les premiers stades de formation de la plaque d'athérome et qui s'accroît dans la progression de la maladie.

Les toutes premières étapes de l'athérosclérose dépendent pour l'essentiel d'un phénomène de dysfonctionnement endothélial. Ce phénomène peut avoir plusieurs origines : l'élévation du taux plasmatique de lipoprotéines de basse densité (LDL), la présence de radicaux libres générés par la consommation de tabac, l'hypertension artérielle, le diabète, la présence de microorganismes infectieux ou encore la perturbation du flux sanguin. L'ensemble de ces facteurs contribue à modifier l'activité des cellules endothéliales qui, d'un état physiologique non activé, acquièrent un phénotype activé inflammatoire. En réponse à cette activation, les cellules endothéliales augmentent l'expression de certaines protéines (*de surface ou sécrétées*) dont les chimiokines, favorisant ainsi le recrutement anormal des leucocytes sur la paroi vasculaire, étape initiant le développement des plaques d'athérosclérose. Ces chimiokines sont également impliquées dans l'étape suivante, à savoir la diapédèse des leucocytes, car l'utilisation d'anticorps neutralisant des chimiokines CCL2 ou CCL5 (Navab, Imes et al. 1991; Randolph and Furie 1995) réduit de façon considérable la transmigration des leucocytes.

En plus de leur rôle déterminant au cours des stades initiaux de la maladie, les chimiokines influencent également la progression de l'athérosclérose. C'est notamment le cas de CCL2. Afin d'illustrer l'effet de cette chimiokine, deux modèles murins hypercholestérolémiques ont été utilisés :

- les souris *ccl2^{-/-}ldlr^{-/-}*, déficientes pour le récepteur au LDL (Gu, Okada et al. 1998)

- les souris *ccl2*^{-/-} *ApoE*^{-/-} déficientes en apolipoprotéine E, un transporteur de cholestérol sanguin (Gosling, Slaymaker et al. 1999) .

Dans ces deux modèles, on observe une diminution de 60-80% de la taille des plaques d'athérome ainsi qu'une diminution de 55% du contenu de ces plaques en macrophages, par comparaison avec les souris contrôles, non déficiente en CCL2. L'invalidation du récepteur CCR2 génère le même type de résultats. A l'image du CCL2, de nombreuses autres chimiokines, dont le CX3CL1, favorisent le développement de l'athérosclérose. Néanmoins il a également pu être montré un rôle protecteur du couple CCL5/CCR5. En effet, l'équipe de Ziad Mallat, montrent que des souris CCR5^{-/-}, soumise à 12 semaines de régime pro-athérogène présentent une stabilisation du développement de leur plaque d'athérome, qui contiennent moins de macrophages que celles des souris contrôles (Zernecke, Liehn et al. 2006).

L'ensemble de ces données confèrent aux chimiokines un intérêt majeur dans la recherche de nouvelles voies thérapeutiques visant à ralentir, voire à prévenir le développement de l'athérosclérose.

E.2 – Chimiokines et Infections virales

Il a également été montré que certains agents pathogènes utilisent les RCK exprimés à la surface des leucocytes pour pénétrer dans la cellule hôte. C'est le cas notamment pour le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il est connu et admis que le virus pénètre dans la cellule hôte en utilisant les protéines de surface de celle-ci. Dans le cas du VIH, il se lie principalement à la protéine cellulaire CD4 par l'intermédiaire de la gp120. Mais la présence de cette protéine n'est pas suffisante à la pénétration du virus dans la cellule hôte. Des corécepteurs sont nécessaires à la fusion des membranes virales et cellulaires. Parmi ces corécepteurs, deux RCK sont utilisés de manière alternative par les différentes souches du VIH : CCR5 et CXCR4. Le premier est nécessaire à l'entrée des souches de VIH infectant les macrophages alors que le second permet l'infection des lymphocytes T (Alkhatib, Combadiere et al. 1996; Deng, Liu et al. 1996).

E.3 – Chimiokines et Cancers

Dans nombre de tumeurs solides, le microenvironnement tumoral est riche en chimiokines. Celles-ci sont sécrétées par les cellules tumorales elles-mêmes ou par les cellules du stroma tumoral telles que les leucocytes infiltrants, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Lazennec and Richmond 2010). Il a par ailleurs été montré que ces chimiokines peuvent réguler le développement tumoral (*positivement ou négativement*) et cela aux différents stades du développement tumoral (**Tableau 2.3**).

Chimiokine	Modèle tumoral	Résultats	Références
CCL2 (inhibition)	Cancer de la prostate	↓ de la croissance et de l'angiogenèse tumorale <i>in vivo</i>	Zhang et al. 2010
	Métastases de cancer du sein	↓ des métastases et ↑ de la survie des animaux	Qian et al. 2011
CXCL5/CXCL8 (inhibition)	Cancer des poumons	↓ de la taille des tumeurs et de la densité	Arenberg et al. 1998 et 1996
	Mélanome	inhibition de la croissance, de l'invasion et de l'angiogenèse tumorale	Huang et al. 2002 ; Malnikova et Bar-Eli. 2006 ; Zigler et al. 2008
CXCL8 (inhibition)	Cancer de la vessie	↓ de la croissance tumorale	Mian et al. 2003
	Cancer du pancréas	↓ de la croissance et de l'angiogenèse tumorale <i>in vivo</i>	Shi et al. 1999
CCL16 (surexpression)	Cancer du sein	↓ de la taille des tumeurs et de la formation de métastases	Guiducci et al. 2004
CCL17 (surexpression)	Cancer du côlon	Régression tumorale	Kanagawa et al. 2007
CCL20 (surexpression)	Cancer des poumons, colorectal et mélanome	↓ de la taille des tumeurs et ↑ de la survie des animaux	Fushimi et al. 2000
CCL22 (surexpression)	Cancer des poumons	Régression tumorale	Guo et al. 2002
CXCL9/CXCL10 (surexpression)	Cancer du sein et fibrosarcome	Régression tumorale et ↑ de la survie des animaux	Palmer et al. 2001
CXCL10 (surexpression)	Hémangiosarcome métastatique	inhibition de la progression tumorale	Giese et al. 2002
	Cancer colorectal	éradication de 100% des tumeurs	Narvaiza et al. 2000
	Myélome	Régression de tumeurs préétablies	Liu et al. 2002
CX3CL1 (surexpression)	Métastases pulmonaires de cancer colorectal et d'ostéosarcome	inhibition des métastases pulmonaires	Richard-Fiardo et al. 2011
XCL1 (surexpression)	Cancer du sein	Régression tumorale	Emtage et al. 1999

Tableau 2.2 : Exemples d'études précliniques – Cancer et Chimiokine

Ces études réalisées par des équipes différentes illustrent l'implication du système chimiokine dans des modèles de cancer. La surexpression de certaines chimiokines au sein de la tumeur à travers l'utilisation d'adénovirus corrèle avec un effet anti-tumorale. A l'inverse l'inhibition d'autres chimiokines semblent présenter un effet pro-tumorale, leur inhibition (souris KO) permet d'inhiber la croissance tumorale.

E.3.1 – Rôle des chimiokines sur la croissance et/ou la survie tumorale

Il est clairement admis que les chimiokines et leurs récepteurs agissent sur le développement tumoral. Leur action peut être directe, par activation de la croissance ou indirecte, en agissant sur la survie des cellules tumorales. La présence de chimiokines dans le microenvironnement tumoral peut donc permettre aux cellules tumorales, exprimant leurs RCK d'engager un processus de croissance de ces cellules (Mukaida and Baba 2012; Verbeke, Geboes et al. 2012).

Dans ce contexte, les chimiokines les mieux caractérisées sont le CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CXCL8 qui fonctionnent comme des facteurs autocrines de croissance dans divers cancers (Brew, Erikson et al. 2000; Dhawan and Richmond 2002; Kollmar, Rupertus et al. 2007; Aldinucci and Colombatti 2014; Muralidhar and Barbolina 2014)

Le rôle pro-tumoral de CXCL12 dans divers cancers a également été démontré par le blocage de ses récepteurs dans des études précliniques. Cette chimiokine, incriminée dans de nombreux cancers dont le cancer du sein, des ovaires ou de la prostate, semble être impliquée à la fois dans la stimulation de la croissance mais également dans la survie.

A l'inverse, il existe des chimiokines anti-tumorales qui exercent leur effet en mobilisant des cellules immunocompétentes qui participent à la mise en place d'une réponse adaptée de l'hôte contre le développement tumoral. Ainsi, en 1993, Luster et al. furent les premiers à mettre en évidence l'impact de l'expression de CXCL10 par les cellules tumorales dans des modèles de tumeurs mammaires sous-cutanées (Luster and Leder 1993). Par la suite, il a été mis en évidence que le recrutement des lymphocytes T CXCR3⁺, par CXCL10, est à l'origine de la régression spontanée des mélanomes (Wenzel, Henze et al. 2005). De la même manière CXCL11 augmente la présence des lymphocytes infiltrant la tumeur et inhibe la croissance tumorale dans les cancers du sein (Hensbergen, Wijnands et al. 2005; Chu, Yang et al. 2007).

E.3.2 – Rôle des chimiokines sur l'angiogenèse tumorale

Afin d'assurer ses besoins en oxygène et en nutriment, le développement tumoral s'accompagne d'une angiogenèse. Ainsi il n'est pas rare que dans les tumeurs solides, l'action angiogénique des chimiokine soit détournée par les cellules cancéreuses au profit de la croissance tumorale (Keeley, Mehrad et al. 2011; Kiefer and Siekmann 2011). Comme décrit plus haut, dans le paragraphe consacré à l'angiogenèse physiologique, les membres de la sous-famille CXC- semblent également jouer un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale. Mais ces chimiokines ne sont pas les seules à être identifiées comme promoteur de l'angiogenèse. La

chimiokine CCL2 est particulièrement impliquée dans l'angiogenèse tumorale (Keeley, Mehrad et al. 2011) où elle induit la migration des cellules endothéliales et la formation des tubes de migration, suite à l'activation de son récepteur CCR2 (exprimé par les cellules endothéliales) (Salcedo, Ponce et al. 2000). Deux études distinctes ont montré que les cellules cancéreuses peuvent produire CCL2 et que l'activation de CCR2 par CCL2 peut impacter directement l'angiogenèse et la croissance tumorales (Salcedo, Ponce et al. 2000; Stamatovic, Keep et al. 2006). La chimiokine CX3CL1 peut également réguler l'angiogenèse (Imaizumi, Yoshida et al. 2004; Zheng, Yang et al. 2013).

Parallèlement à cet effet direct des chimiokines sur l'angiogenèse, un effet indirect des chimiokines a été décrit. En effet, une angiogenèse peut également être induite par l'action de facteurs pro-angiogéniques non chimiokiniques (tels que le VEGF- Vascular endothelial growth factor) sécrétés par les leucocytes, qui eux ont été recrutés par les chimiokines sécrétées par les tumeurs (Kiefer and Siekmann 2011). CX3CL1 fait parti de ces chimiokines modulant l'angiogenèse tumorale de manière indirecte par le biais d'un recrutement macrophagique (Lee, Choi et al. 2013).

E.3.3 – Rôle des chimiokines dans la dissémination tumorale

La dissémination des cellules tumorales au sein de l'organisme n'est pas un processus aléatoire mais plutôt un processus contrôlé par des mécanismes spécifiques de la tumeur d'origine et de l'organe secondaire dans lequel se développent les métastases. En 2001, Müller et al. ont mis en évidence pour la première fois l'implication des chimiokines dans la domiciliation organe-spécifique des cellules métastatiques mammaires. Ils ont ainsi montré que les RCK, CXCR4 et CCR7, sont surexprimés par les cellules tumorales de cancer du sein (Muller, Homey et al. 2001). Les ligands correspondant à ces récepteurs (respectivement CXCL12 et CCL21) sont exprimés de manière constitutive dans les organes cibles des métastases de ces cancers (*les ganglions lymphatiques, les poumons, le cerveau, le foie et la moelle osseuse*). Les auteurs ont démontré que ces deux récepteurs jouent un rôle déterminant dans la domiciliation des cellules tumorales mammaires dans les poumons et dans les ganglions lymphatiques. Il est maintenant bien établi que le profil d'expression RCK par les cellules tumorales, associé à la production des ligands correspondants dans les organes, oriente la progression métastatique. Le nombre et la nature des RCK impliqués dans ce processus dépendent à la fois de la tumeur d'origine et de l'organe secondaire concerné. Le CXCR4 est le RCK le plus étudié dans la dissémination des cellules cancéreuses. Il est surexprimé dans plus de 20 cancers différents (Raman, Sobolik-Delmaire et al. 2011; Zlotnik, Burkhardt et al. 2011) dont le cancer colorectal (Ottiano, di Palma et al. 2005). Dans ce dernier, il a été rapporté

qu'une forte expression de CXCR4 est associée à la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques (Schimanski, Schwald et al. 2005) et au niveau du foie (Kim, Mori et al. 2006), ainsi qu'à une augmentation de la récurrence tumorale. Par ailleurs, une expression élevée de CXCR4 est inversement corrélée à la survie des patients (Yopp, Shia et al. 2012). Le récepteur CXCR3 semble également impliqué dans la dissémination métastatique de différents cancers. Ce récepteur exprimé à la surface des cellules tumorales mammaires participe activement à la mise en place des métastases de ces cancers dans les poumons (Walser, Rifat et al. 2006). C'est également le cas du CX3CR1 dans le cadre du cancer pulmonaire ou colorectal (**Tableau 2.3**).

III. La chimiokine CX3CL1 et son récepteur le CX3CR1

L'histoire de ce couple récepteur – ligands commence en 1995, avec la découverte d'un récepteur CMKBRL1 (*CheMoKine β Receptor Like 1*), renommé ensuite CX3CR1 (Combadiere, Ahuja et al. 1995). Quelques années plus tard, son ligand est à son tour identifié, il s'agit d'une chimiokine à la signature cystéique insolite. En effet ses deux cystéines N-terminales sont espacées de 3 aa d'où son nom : CX3CL1. Encore à l'heure actuelle, elle demeure l'unique chimiokine de ce type mais également l'unique ligand physiologique connu de CX3CR1.

Cette chimiokine se révèle être aussi surprenante par sa structure que par ses fonctions.

A] La chimiokine CX3CL1, une chimiokine un peu particulière...

A.1 – Structure

CX3CL1, appelée initialement fractalkine, est une chimiokine particulière à plus d'un titre. La première particularité de CX3CL1 réside dans sa taille et sa localisation cellulaire. Alors que la séquence peptidique de la plupart des chimiokines dépasse rarement les 100 aa, celle du CX3CL1 en compte 373, formant une glycoprotéine transmembranaire de 90 kDa, composée de 4 domaines distincts (Figure III-1):

- Un domaine chimiokine, situé dans la partie N-terminale et constitué de 76 aa, il contient le motif CX3C. Il s'agit du support de l'activité biologique. La structure tertiaire de cette région est comparable à celle des chimiokines de type CC- et CXC-, sa seule particularité étant un noyau central plus compact, lié à l'espacement des cystéines N-terminales par 3 aa.
- Un tronc mucine de 241 aa constitué de la répétition de 17 motifs de type mucine, riche en résidus sérine et thréonine hautement glycosylés (glycosylation de type O). Ce tronc de 26 nm ne semble pas présenter de fonction spécifique en dehors de la présentation du CX3CL1 à la surface cellulaire (Fong, Erickson et al. 2000; Haskell, Cleary et al. 2000; Ostuni, Guellec et al. 2014)
- Un segment transmembranaire de 18 aa hydrophobes
- Un court domaine intracellulaire de 37 aa.

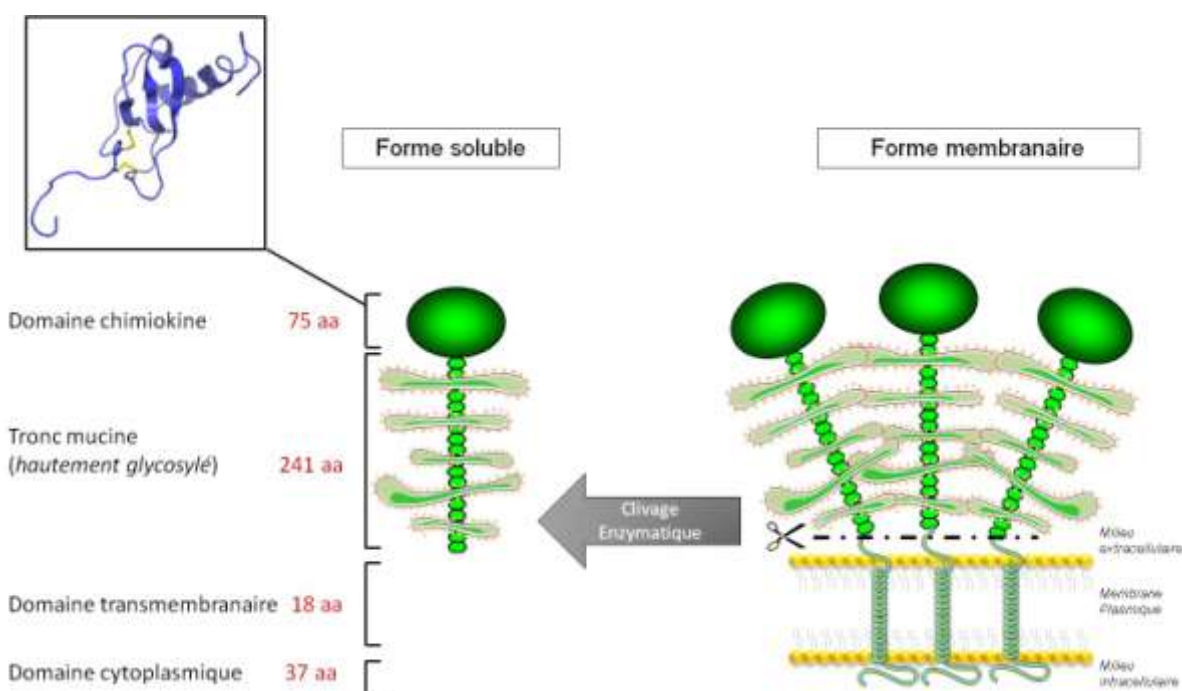


Figure III-1 : Structures schématiques des deux formes physiologiques du CX3CL1. Le CX3CL1 est une molécule membranaire composée de 4 régions distinctes, un domaine chimiokine, un tronc mucine, un domaine transmembranaire et une région cytosolique. Son clivage par des metalloprotéases induit la libération de la forme soluble contenant le domaine chimiokine et le tronc mucine. Ce tronc mucine est hautement glycosylé. (Encadré : structure tertiaire du domaine chimiokine).

La seconde particularité du CX3CL1 vient au fait qu'il existe - comme CXCL16 - sous deux formes physiologiquement actives : une forme native membranaire et une forme soluble. La forme soluble, chimio-attractante, résulte d'un clivage enzymatique de la forme membranaire par des metalloprotéases, ADAM-10 et -17 (Garton, Gough et al. 2001; Tsou, Haskell et al. 2001) au niveau d'un motif dibasique situé en C-terminal. La troisième particularité de CX3CL1, la plus originale pour une chimiokine réside dans sa capacité, sous sa forme membranaire, à provoquer une adhésion des cellules circulantes CX3CR1⁺ et cela indépendamment des molécules d'adhésion classiques telles que les intégrines ou les sélectines (Fong, Robinson et al. 1998; Haskell, Cleary et al. 1999).

A.2 – Relation structure – fonctions

A.2.1 – Domaine chimiokine

Il s'agit du domaine responsable de l'activité biologique du CX3CL1. La suppression totale ou partielle (délétion des 7 premiers aa) de ce domaine chimiokine abolit la liaison au CX3CR1 et l'ensemble des réponses cellulaires associées (*chimiotactisme, adhésion...*). Des expériences de mutations dirigées ont permis de mettre en évidence les aa importants d'un

point de vue fonctionnel. Les lysines en position 7, 15, 19, 37 et 47 ainsi que les arginines en position 38 et 45 apparaissent comme essentielles, leurs mutations en alanine affectent lourdement, voire supprime, la liaison au récepteur affectant autant les fonctions chimiotactiques qu'adhésives (Mizoue, Bazan et al. 1999).

A.2.2 – Tronc mucine

L'affinité du CX3CL1 pour son récepteur n'est pas différente selon que le ligand soit sous forme du domaine chimiokine seul ou sous une forme complète (domaine chimiokine + tronc mucine). Cette affinité n'est pas modifiée si le tronc mucine est substitué par un tronc différent, type sélectine. Ainsi le tronc mucine ne semble pas modifier la qualité de la liaison avec le récepteur et n'affecte pas les propriétés chimiotactiques du ligand. Ce qui n'est pas le cas des propriétés adhésives. En effet, il a été montré, au travers d'expériences d'adhésion sous flux, que l'adhésion de cellules CX3CR1⁺ se faisait plus efficacement lorsque le domaine chimiokine de CX3CL1 est présenté à l'aide du tronc mucine comparé au domaine chimiokine seul. De même, il semble que la glycosylation est essentielle pour « rigidifier » le tronc mucine et permettre au domaine chimiokine de sortir du glycocalyx pour une adhérence plus efficace (Ostuni, Guellec et al. 2014). Cependant, la seule existence d'un tronc mucine présentant une chimiokine à la surface d'une cellule ne suffit pas à générer une adhésion. En effet, des molécules chimères réalisées avec les domaines chimiokines de CCL2, CCL5, CCL4 ou CXCL8 fusionnés avec le tronc mucine de CX3CL1 ne donne pas lieu à des couples adhésifs comme observé avec le couple CX3CL1/CX3CR1 (Haskell, Cleary et al. 2000).

A.2.3 – Domaine transmembranaire

En plus de son rôle évident dans l'ancrage membranaire du CX3CL1, il a été démontré au sein de notre équipe que ce domaine avait un rôle prépondérant dans l'oligomérisation du CX3CL1 membranaire. En effet, le CX3CL1 sous cette forme membranaire n'est pas monomérique mais oligomérique. Cette conformation semble indispensable à sa fonction adhésive. Cependant aucun motif d'oligomérisation classique n'a pu être mis en évidence au sein du domaine transmembranaire : seule la mutation d'au moins 12 aa de ce domaine en 12 alanine permet l'obtention d'un mutant non adhésif (Hermand, Pincet et al. 2008)

A.2.4 – Domaine intracellulaire

Des études sur le CX3CL1 murin, présentant les mêmes caractéristiques que le CX3CL1 humain, suggèrent que le domaine intracellulaire n'est pas indispensable aux fonctions cellulaires associés au CX3CL1 (*adhésion, chimiotactisme, diapédèse*). Par contre

son existence et sa composition sont essentielles au recyclage permanent de la chimiokine (Kumar, Kremer et al. 2011), ainsi qu'à sa maturation, à son adressage à la membrane, au son clivage constitutif et à son endocytose (Andrzejewski, Koelsch et al. 2010).

A.3 – Expression du CX3CL1

A.3.1 – Sites de production

Le CX3CL1 est exprimé au niveau de nombreux organes tels que le cœur, le rein, les poumons, les testicules/ovaires, le cerveau, l'œil, les amygdales, les organes lymphoïdes secondaires ou encore au sein de l'épithélium cutané. Dans le système nerveux central, cette chimiokine est produite par les neurones (Clark, Yip et al. 2009). Dans la peau, outre les cellules endothéliales, les mélanocytes comme les cellules de Langerhans ou les kératinocytes peuvent être à l'origine de la production de CX3CL1. On rapporte également une production de CX3CL1 par différents types de tumeurs dont le neuroblastome, le carcinome hépatocellulaire, le mélanome, les tumeurs colorectales (Marchesi, Locatelli et al. 2010) ou encore les carcinomes épithéliaux ovariens (Gaudin, Nasreddine et al. 2011).

Le CX3CL1 a été initialement découvert sous sa forme membranaire à la surface de cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) activées par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'Interleukine-1 (IL-1) (Bazan, Bacon et al. 1997). De ce fait, le CX3CL1 est d'abord considéré comme chimiokine inductible. Par la suite, son expression constitutive sera mise en évidence grâce à la détection de l'ARNm et de la protéine sans pré-activation des cellules. Ainsi le CX3CL1 fait partie de ces chimiokines dont l'expression est aussi bien inductible que constitutive. Le profil d'expression constitutive ou inductible du CX3CL1 est résumé dans le tableau (**Tableau 3.1**).

A.3.2 – Régulation de l'expression

La régulation de l'expression du CX3CL1 se fait à plusieurs niveaux. Comme pour toutes les autres chimiokines, il existe une régulation de la synthèse au niveau des étapes de transcription et de traduction de la protéine. Sa structure transmembranaire offre un second niveau de régulation par le biais d'un contrôle du clivage de la forme membranaire et donc de la libération de la forme soluble. L'expression du CX3CL1 et son clivage sont généralement induits par des stimuli pro-inflammatoires qui conduisent à une augmentation simultanée de la forme membranaire et de la forme soluble. Parmi ces stimuli, on rapporte le LPS, l'IL-1 β , le TNF- α ou encore l'IFN- γ . La néosynthèse du CX3CL1 est induite par ces stimuli pro-

inflammatoires via différentes voies de signalisation tels que la signalisation NF- κ B (**N**uclear **F**actor –**K**appa **B**), JAK/STAT ou encore P38/MAPK/ MAPK Kinase (Yang, Mattagajasingh et al. 2007; Matsumiya, Ota et al. 2010).

Système	Organes	Cellules	Type d'expression Inductible/ C onstitutive
Immunitaire	Moelle Osseuse	Cellules myéloïdes	C
	Sang	Monocytes	
	Nodule	Cellules dendritiques	
	Lymphoïde	Natural Killer	
	Thymus	Lymphocytes T	
	Amygdale	(CD4+/CD8+)	
	Peau	Lymphocyte B	
		Cellules Endothéliales	
Cardio-Vasculaire	Artères	Cellules Musculaires	I (par TNF- α / IFN- γ / IL-1, thrombine)
	Vaisseaux	lisses	
	veineux	Cellules endothéliales	
	Artères coronaires		
	Cœur	?	C
Urinaire	Rein	Cellules endothéliales	I (par TNF- α / IFN- γ / IL-1, thrombine)
		Cellules Epithéliales	
		Fibroblastes	
Digestif	Colon	?	C
Reproductif	Ovaires	?	C
	Testicules		
Cérébral	Cerveau	Neurones	C
	Œil (Rétine et Iris)	Astrocytes Cellules stromales et endothéliales	
			I (par par TNF- α / IFN- γ / IL-1 β)

Tableau 3.1 : Expression du CX3CL1 selon le tissu et le type de cellule.

L'augmentation du clivage de CX3CL1 résulte directement d'une stimulation de la production des metalloprotéases, notamment ADAM-10 (Hundhausen, Schulte et al. 2007).

L'expression membranaire du CX3CL1 est également régulée par son endocytose constitutive. En effet, comme beaucoup de protéines membranaires, le CX3CL1 est sujet à un recyclage permanent (Kumar, Kremer et al. 2011). Actuellement, le CX3CL1 est la seule chimiokine pour laquelle est décrit un mécanisme d'internalisation. Le CX3CL1 internalisé est alors protégé du clivage par les metalloprotéases et pourra être redirigé vers la membrane lors d'une inflammation et ainsi augmenter rapidement le nombre de molécules de CX3CL1 présentes à la surface sans passer par une néosynthèse (Huang, Su et al. 2009).

B] CX3CR1

En 1994, Harrison et al. caractérisent chez le rat une molécule transmembranaire de 355 aa : RBS11 qui est couplée aux protéines G et possédant les caractéristiques des RCK (Harrison, Barber et al. 1994). Un an plus tard, deux groupes distincts identifient, chez l'Homme, une protéine présentant 80% d'homologie avec RBS11 et plus de 40% d'homologie avec les récepteurs aux chimiokines de type CCR, ils nomment cette molécule V28/CMKBRL1 (**CheMoKine Beta Receptor Like-1**) (Combadiere, Ahuja et al. 1995; Rapport, Schweickart et al. 1995). Ce récepteur reste orphelin jusqu'à ce que l'équipe de Bazan découvre le CX3CL1 (Bazan, Bacon et al. 1997) qui encore aujourd'hui est le seul ligand connu de CX3CR1.

B.1 – Structure

Le CX3CR1 humain possède la structure classique des RCK : il s'agit d'un RCPG de classe IA de 355 aa (**Figure III-2**). Les études biochimiques de l'interaction récepteur-ligand ont montré que le CX3CR1 lie le CX3CL1 par son domaine chimiokine, indépendamment de la présence du tronc mucine. Cette interaction, spécifique et affine, présente une constante de dissociation à l'équilibre (K_d) comprise entre 30pM et 1nM en fonction du type cellulaire. Néanmoins, l'affinité du CX3CL1 pour le CX3CR1 est généralement décrite comme moins bonne que celle des autres chimiokines pour leurs récepteurs exprimés au sein d'un même type cellulaire. A titre de comparaison, alors que les constantes de dissociation de CCL2 et CCL5 pour leurs récepteurs respectifs, CCR2 et CCR5, exprimés à la surface de cellules HEK293 sont de l'ordre de 0.26nM et 0.14nM, celle du couple CX3CL1-CX3CR1 est de 0.74nM (Combadiere, Salzwedel et al. 1998).

Seuls les résidus tyrosine 14, aspartate 25 et glutamate 254 semblent être importants dans la capacité du CX3CR1 à lier le CX3CL1. En effet, toute autre mutation en alanine des aa du domaine N-terminal ou de la boucle ECL3 n'entraîne aucune perte de liaison du CX3CL1 au CX3CR1. Cependant, des mutations en alanine des résidus glutamate 13, aspartate 16 et 266 génèrent des récepteurs variants qui conservent leur capacité de liaison au CX3CL1, avec une affinité identique à celle du récepteur sauvage, mais qui ne peuvent plus activer certaines voies de signalisation comme la voie ERK, voire qui n'engendrent plus de réponse chimiotactique (Chen, Green et al. 2006). Ces résultats sont compatibles avec un modèle d'interaction récepteur-ligands à deux étapes, classiquement décrit lors de la liaison d'une chimiokine à son récepteur (cf. Chapitre II -§ C.2)

En dehors des modifications post-traductionnelles communes aux RCPG de famille I (*ponts disulfures, palmylation, ...* cf. Chapitre I-§ A.2.1), le domaine N-terminal du CX3CR1 comporte deux sites de sulfatations sur les tyrosines 14 et 22. La désulfatation du récepteur entraîne une diminution d'un facteur 100 de son affinité pour le CX3CL1 (Fong, Alam et al. 2002).

L'homodimérisation du CX3CR1 a été mise en évidence et étudiée au sein de notre laboratoire par les techniques de FRET (Darbandi-Tehrani, Hermand et al. 2010). A ce jour aucune hétérodimérisation n'a été mise en évidence pour ce récepteur.

B.2 – Polymorphisme génétique du CX3CR1

Cinq variants du CX3CR1 humain ont été mis en évidence par la technique de détection systématique de mutations SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism). Ces variants résultent d'une modification de la région codant les segments transmembranaires du CX3CR1 (Faure, Meyer et al. 2000). Parmi ces variants, deux sont particulièrement fréquents dans la population humaine. Ils résultent d'une double substitution, la première transforme la valine en position 249 en une isoleucine (V249I), alors que la seconde correspond à la substitution de la thréonine 280 en une méthionine (T280M). Ces deux mutations sont présentes dans la population caucasienne à une fréquence allélique respective de 25.5% et de 14%. Elles sont en complet déséquilibre de liaison : la seconde mutation n'apparaissant que si la première est présente. Ainsi seul 3 haplotypes sur 5 sont représentés dans la population humaine: V249-T280 (70% de fréquence), I249-T280 (15% de fréquence) et I249-M280 (13% de fréquence) et 6 génotypes possibles (VV-TT, VI-TT, VI-TM, II-TT, II-TM et II-MM). Ces deux aa variants (en position 249 et 280) sont situés du côté extracellulaire du 6^{ème} et 7^{ème} segment transmembranaire ne semblent pas participer pas au site de liaison du ligand à son récepteur. En effet, leur mutation ne présente aucune

conséquence sur ce paramètre. L'existence de ces variants du CX3CR1 a été associée à des modifications des propriétés fonctionnelles de ce récepteur et particulièrement de la fonction adhésive du couple CX3CR1/CX3CL1 qui sera détaillée plus loin dans la partie « Fonctions associées au CX3CR1/CX3CL1 ». Jusqu'ici, les études portant sur une transduction de signal en aval des différents variants activés par la forme soluble, (*étude des signaux calciques et des voies MAPK*) n'ont montré aucune différence (Daoudi, Lavergne et al. 2004); (Lavergne, Combadiere et al. 2004; Davis and Harrison 2006). Par contre, l'existence de ces variants impacte l'épidémiologie associée à ce couple CX3CL1/CX3CR1. Les conséquences de ce polymorphisme seront développées dans la partie consacrée aux rôles physiopathologiques de ce couple, avec notamment l'implication différentielle des variants au cours de l'évolution du VIH, de la DMLA ou encore des pathologies cardiovasculaires (**Tableau 3.2**).

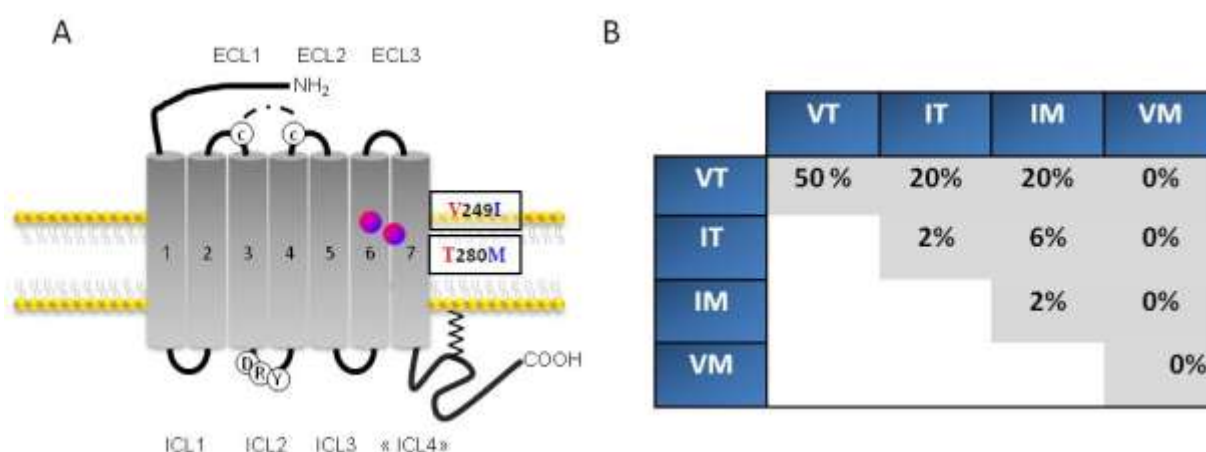


Figure III-2 : Représentation schématique des variants génétiques du CX3CR1

- A- Positions des deux substitutions (V 249 I et T 280 M) à l'origine du polymorphisme génétique du CX3CR1
 B- Combinaisons haplotypiques possibles et fréquences des génotypes dans la population caucasienne (d'après Faure et al. 2000)

B.3 – Expression du CX3CR1

Chez l'Homme, le CX3CR1 est principalement exprimé à la surface de cellules issus des cellules souches hématopoïétiques parmi lesquelles les monocytes, les cellules microgliales, les NK CD56^{dim}CD16⁺ ainsi que sur certaines sous populations de lymphocytes. Au sein même de ces différentes populations, son niveau d'expression est variable, générant des sous-populations selon ce nouveau critère.

B.3.1 – Les monocytes

Plusieurs études indiquent que les monocytes du sang sont constitués de plusieurs sous-populations cellulaires, qui diffèrent par leur taille, leur morphologie nucléaire, leur

granularité, leur fonction, leurs antigènes de surface (plus particulièrement CD16 et CD14) ou encore leur profil d'expression des RCK (CCR2 et CX3CR1). Chez l'Homme comme chez la souris, deux sous-populations principales ont été décrites : les monocytes « classiques » et les monocytes « non-classiques » (Figure III-3) (Geissmann, Jung et al. 2003; Anbazhagan, Duroux-Richard et al. 2014). Une troisième sous population qualifiée d'intermédiaire est également évoquée dans la bibliographie, mais reste controversée. Aussi par soucis de simplicité, nous nous limitons ici à la description des deux sous-populations majeures.

Les monocytes « classiques », également connus sous le nom de monocytes inflammatoires, représentent 85-90% des monocytes circulants chez un individu sain. Cette catégorie de monocyte, CD14⁺CD16⁻, expriment un fort niveau de CCR2 et un faible niveau de CX3CR1. Chez la souris, ces monocytes sont caractérisés par l'expression d'un fort niveau de Ly6C, de CCR2 et de L-sélectine (CD62L). Le CX3CR1 est faiblement exprimé à la surface de cette sous-population. Ces monocytes présentent une forte activité phagocytaire.

Effet Protecteur du variant IM		Effet néfaste du variant IM	
Pathologie	Références	Pathologie	Références
Infarctus du myocarde	Lavergne, E. 2005	Infarctus cérébral	Lavergne, E. 2005
Maladie coronariennes	Moatti, D. 2001 / Apostolakis, S. 2007	DMLA	Chan, C.C. 2005 / Comabdière, C. 2007
Maladie occlusive de l'artère coronaire interne	Ghilardi, G. 2004	Vasculite rétinienne	Wallace, G.R. 2006
Athérosclérose	McDermott, D.H. 2011 / Nassar, B.A. 2008	Maladie de Crohn	Brand, S. 2006 / Binion, D.G. 2006 / Sabate, J.M. 2008
Athérosclérose après VIH	Coll, B. 2007	Sclérose systémique	Marasini, B. 2005
Douleurs neuropathiques	Combadière, C. 2008	Asthme	Tremblay, K. 2006
Pneumoconiose	Nadif, R. 2006	VIH	Faure, S. 2000 et 2003 / McDermott, D.H. 2000 / Hendel, H. 2001
Rejet de transplantation cardiaque	Simeoni, E. 2005	Fibrose hépatique	Wasmuth, H.E. 2008
Atopie allergique	Depner, M. 2007	Virus respiratoire syncytial	Amantidou, V. 2006

Tableau 3.2 : Impact du polymorphisme de CX3CR1 dans différentes pathologies

La sous population de monocytes dite « non-classique » ne représente que 10-15% de la population monocyttaire totale chez l'Homme. Ils ont une fonction de « patrouilleurs »

(Kumar, Tripathi et al. 2012). Selon certains auteurs, cette sous population dériverait de la première. Chez la souris, ces cellules sont caractérisées par une expression faible de Ly6C et CCR2 mais un haut niveau d'expression de CX3CR1. Chez les humains, les monocytes non classiques sont CD14^{low} CD16⁺ CCR2^{low} CX3CR1^{hi}.

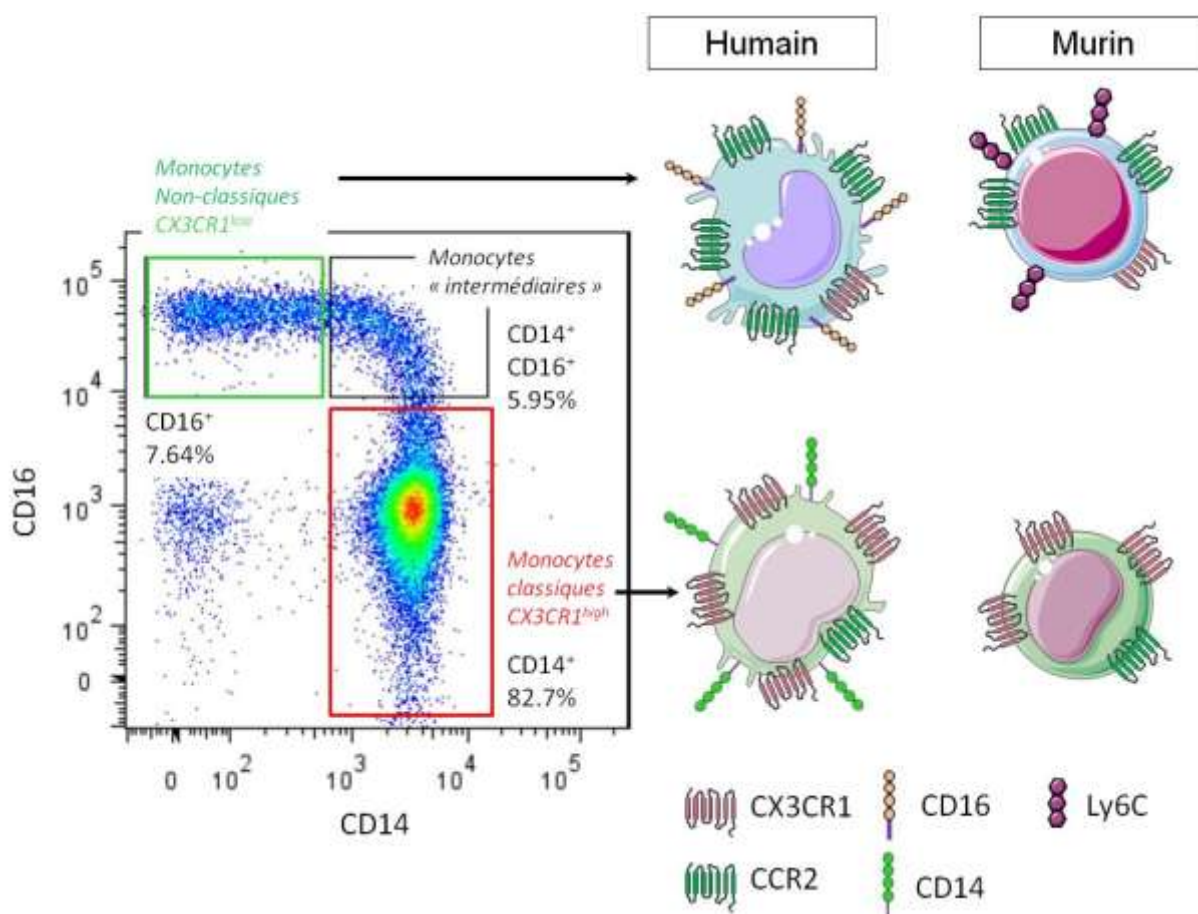


Figure III-3 : Représentation schématique des deux principales sous-populations de monocytes chez l'humain et la souris (d'après Shen and al.2004).

Deux sous-populations monocytaires majeures sont décrites aussi bien chez l'Homme que chez la souris : les monocytes « classiques » (CX3CR1⁺/CCR2⁻/CD14⁺ chez l'Homme ou Ly6C⁻ chez la souris) et les monocytes « non classiques » (CX3CR1⁺/CCR2⁺/CD16⁺ ou Ly6C⁺).

B.3.2 – Les lymphocytes

Le CX3CR1 est exprimé à la surface de plus de 14% de lymphocytes T mais rarement exprimé par les lymphocytes B. Parmi la population des T, les T CD8⁺ décrits comme des cellules mémoires activées, l'expriment à hauteur de 30-40% contre 5-10% pour les T CD4⁺. Plus généralement, la majorité des lymphocytes CX3CR1⁺ possèdent des granules cytoplasmiques contenant la perforine ou le granzyme B, ce qui suggère que le CX3CR1

pourrait être considéré comme un marqueur de surface supplémentaire des lymphocytes cytotoxiques.

B.3.3 – Les autres cellules CX3CR1⁺

Le CX3CR1 et son ligand CX3CL1 sont exprimés à la surface des DC, matures comme immatures. Les formes matures présentent un niveau d'expression plus important que les formes immatures (Liu, Lu et al. 2011), laissant penser à un mécanisme d'activation et/ou de régulation autocrine.

Parmi les cellules myéloïdes exprimant le CX3CR1, autres que celles citées plus haut, on retrouve les plaquettes, les neutrophiles ou encore les mastocytes.

Néanmoins, d'autres types cellulaires, non myéloïdes expriment ce récepteur. En effet des souris déficientes pour ce récepteur, en plus de troubles liés à un défaut de migration et de recrutement leucocytaire, présentent une malformation des connexions neuro-gliales (Jung, Aliberti et al. 2000). Ces observations suggèrent une expression cérébrale du CX3CR1. Parmi les cellules du système nerveux central exprimant le CX3CR1, on trouve les cellules microgliales et les astrocytes mais également certains types neuronaux dont les dopaminergiques.

Le CX3CR1 est également présent à la surface des cellules musculaires lisses (Lucas, Bursill et al. 2003).

B.3.4 – Régulation de l'expression du CX3CR1

A l'image de celle du CX3CL1, l'expression du CX3CR1 est sujette à une régulation complexe spécifique à chaque type cellulaire. Globalement une augmentation du niveau de l'expression du CX3CR1 est synonyme d'inflammation et est associée à l'augmentation dans le milieu de facteurs cytotoxiques tel que les interleukines ou les cytokines. A titre d'exemple, dans le système nerveux central, certains stimuli pro-inflammatoires, tel que TGF- β , augmentent le niveau d'expression du CX3CR1 en activant la production d'ARNm et la production protéique du CX3CR1. Cependant, alors que cette observation est vraie dans les cellules microgliales, il a été démontré que le TNF- β n'a aucun effet sur l'expression du CX3CR1 dans les astrocytes (Chen, Luo et al. 2002; Daoudi, Lavergne et al. 2004).

La modulation de l'expression du CX3CR1 n'implique pas forcément une modulation du niveau de transcription et de traduction de la protéine. En effet, dans les monocytes, il semble que le CCL2 stimule le niveau d'expression du CX3CR1, sans moduler la transcription

ni la traduction mais en libérant du CX3CR1 pré-synthétisé et contenu dans le cytoplasme cellulaire (Green, Han et al. 2006).

B.4– Transduction du signal en aval du CX3CR1

Comme pour tous les RCK, la liaison du CX3CL1 au CX3CR1 est à l'origine de l'activation de plusieurs cascades de signalisation parallèles (Figure III-4). Le CX3CR1 est, comme tous les RCK, un RCPG couplé à une protéine $G\alpha_i$. Certaines des voies de signalisation en aval de CX3CR1 impliquent l'activation de la protéine $G\alpha_i$ alors que d'autres voies en sont indépendantes. Plusieurs signaux ont été étudiés en aval du CX3CR1 activé par la forme soluble de son ligand, d'autres sont admis sans avoir été caractérisés, faute d'outils performants, c'est le cas notamment du signal AMPc qui fait l'objet de ma thèse. Dans cette partie seront présentés les signaux cellulaires et voies de signalisation décrites en aval du CX3CR1 avant ce travail de thèse.

B.4.1 – Signal Calcique

Comme en aval de tous les RCK, l'activation du CX3CR1 par addition de son ligand soluble la chimiokine CX3CL1 déclenche une augmentation, rapide et transitoire (durée <1min), de calcium par activation de la voie IP3 (Imai et al. 1997). L'existence et l'amplitude de cette réponse dépendent toutefois du type cellulaire. En effet dans l'étude réalisée par l'équipe d'Imai en 1997, cette réponse présente dans les K-562 (cellules pré-érythrocytaires) n'est pas retrouvée dans la lignée Raji (lymphoblast-like cells) transfectées avec du CX3CR1. Dans les K-562, le signal calcique peut être supprimé soit à la suite de la mutation du motif DRY, réputé comme participant à la liaison protéine G-récepteurs (Haskell, Cleary et al. 1999; Haskell, Cleary et al. 2000; Schwarz, Pruessmeyer et al. 2010) soit après un traitement à la PTX, ce qui suggère l'implication de la protéine G_i . De manière intéressante, Harrison *et al.* Mettent en évidence une signalisation calcique différentielle en fonction d'une activation du récepteur par la forme soluble ou par la forme membranaire du ligand semble pas induire une signalisation calcique différente (Harrison, Jiang et al. 1998). Selon leur étude, réalisée sur des cellules microgliales de rat exprimant le CX3CR1, seule la forme membranaire de CX3CL1 induit une réponse calcique en aval de CX3CR1. Ce résultat contraste nettement avec les données de la littérature citée plus haut et n'a pas été confirmée par les expériences réalisées au laboratoire. L'étude du signal calcique en aval des RCK sur cellule unique, par les techniques classiques telles que le Fura-2, n'ont pas permis l'étude de la réponse en aval de CX3CR1, qui contrairement au autres couples récepteur/chimiokine présente une réponse d'amplitude très faible et donc difficilement étudiable quand elle est présente. C'est

principalement pour cette raison que nous avons cherché une autre voie de signalisation qui nous permette d'étudier les différences potentielles de signalisation en fonction de la forme de CX3CL1 activant le récepteur.

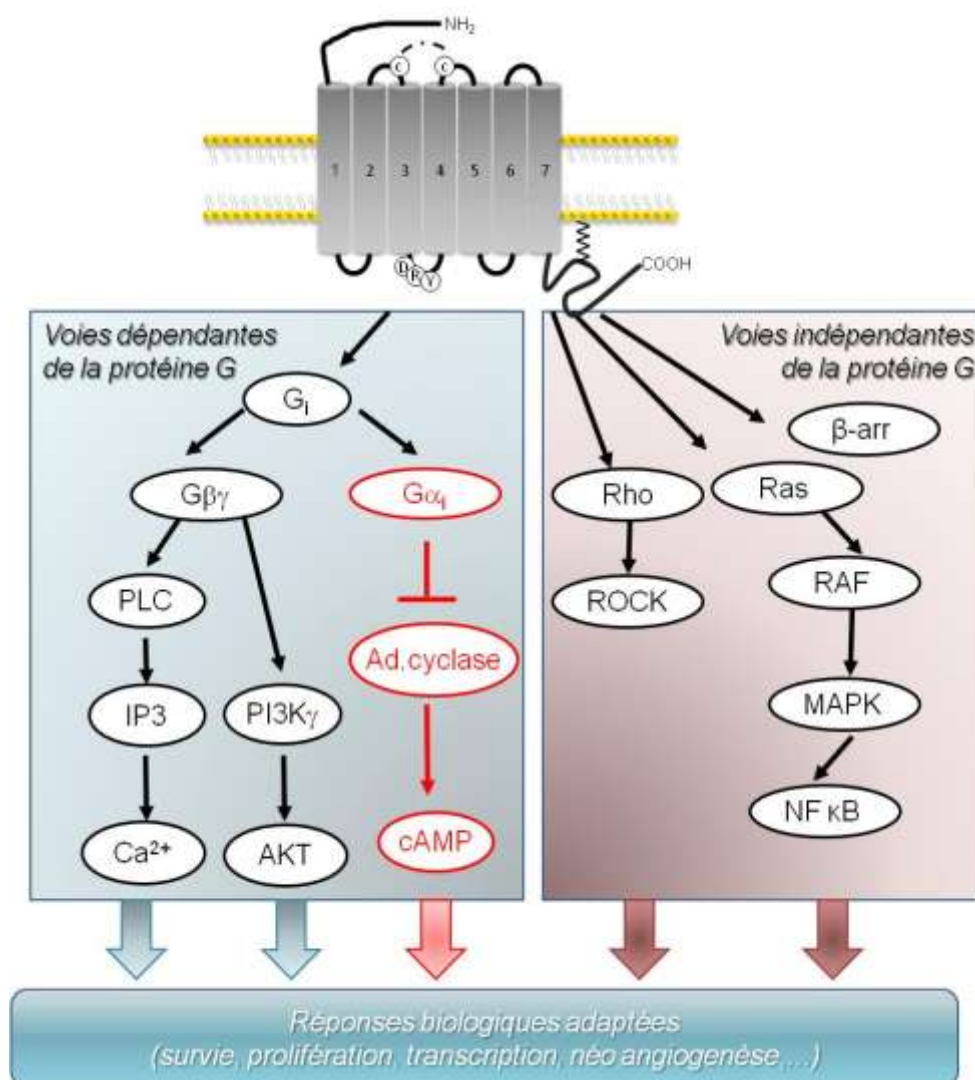


Figure III-4 : Représentation des principales voies de signalisation connues induites en aval du CX3CR1.

Une multitude de voies de signalisation sont activées en aval du CX3CR1. Loin d'être exclusives, elles peuvent être activées simultanément. On distingue deux grandes familles, les voies de signalisation impliquant l'activation préalable de la protéine G ou indépendantes de cette dernière.

B.4.2 – La voie AMP cyclique

La fonction primaire d'une protéine G et plus particulièrement de type G_i , est de moduler l'activité de l'AC, responsable de la production d'AMPc intracellulaire. Bien que cette voie est admise d'un point de vue théorique en aval du CX3CR1 car observée en aval d'autres RCK (Nardelli, Tiffany et al. 1999) dont le CCR1, elle n'a pas été explicitée en aval de

CX3CR1. L'étude et la caractérisation de ce signal, représentant le principal objectif de ce travail de thèse, seront présentées dans la seconde partie du manuscrit.

B.4.3 – Interaction entre les voies de transduction calcique et AMPc

De nombreux ligands des cellules immunes influencent aussi bien le calcium intracellulaire que le niveau d'AMPc. Il est clair par ailleurs que de nombreux effecteurs de la voie AMPc sont sensibles à la concentration de calcium intracellulaire, à commencer par les AC (**Tableau1.2**). L'interaction entre les deux voies de transduction est bien documentée dans le système nerveux central, où, par exemple, leur coordination par calmoduline interposée permet la sécrétion d'insuline ou la génération de « potentiation à long terme » (Willoughby, Halls et al. 2012; Averaimo and Nicol 2014). Par contre, cette coordination est beaucoup moins étudiée dans les cellules immunes, à l'exception du travail de C.Randriamampita (Conche, Boulla et al. 2009) montrant qu'une augmentation transitoire d'AMPc induit la potentiation de l'activation des lymphocytes T et en particulier de la réponse calcique. Pour ce qui est de la signalisation chimiokinerigique, les quelques études qui se sont intéressées à la question des interactions entre les deux voies concluent plutôt à un découplage. En effet, une étude moléculaire détaillée sur le CCR2 a montré qu'il était possible de trouver des mutants du récepteur et/ou de la chimiokine qui activent la voie calcique sans activer la voie AMPc, d'autres qui activent la voie AMPc sans activer la voie calcique et que ces deux voies peuvent être activées alors que la fonction chimiotactique est inhibée (Jarnagin, Grunberger et al. 1999). La question de la coordination éventuelle dans les cellules immunes entre l'immunomodulateur qu'est l'AMPc et l'activateur des fonctions sécrétoires qu'est le calcium intracellulaire reste donc entière.

B.4.4 – Voie des MAP-Kinases

Parallèlement à la voie calcique, qui représente la voie de signalisation la plus étudiée en aval du CX3CR1 et plus globalement des RCK, il existe une multitude d'autre voies. Ces voies passent par l'activation des tyrosines kinases de la famille Src/Syk et des MAPK. Elles sont responsables de la modulation de nombreux facteurs de transcription tel que le NF- κ B. Ces voies aboutissent à la stimulation de la prolifération des cellules et à leur différenciation (Garcia, Xia et al. 2000; Cambien, Pomeranz et al. 2001; Cotter, Williams et al. 2002). Cinq de ces voies ont bien été caractérisées en aval du CX3CR1:

- Syk/ERK1/2 → Dans la lignée monocyttaire MonoMAC6 stimulée avec CX3CL1, on observe une phosphorylation rapide (<1min) et transitoire (>5min) de la protéine

p72-Syk ainsi qu'une phosphorylation de ERK plus tardive (10min) mais persistante (>1h) (Cambien, Pomeranz et al. 2001)

- Src/P-38/MAPK → Dans les même cellules (MonoMAC6), une seconde série de phosphorylation est rapportée, portant sur la protéine kinase Src ainsi que sur la p-38 avec des cinétiques là encore différentielles (Cambien, Pomeranz et al. 2001).
- JNK → Toujours dans les MonoMac6, une phosphorylation à long term (6h) de JNK1 est observée (Cambien, Pomeranz et al. 2001).
- PI3K et sa cible PKB → Dans des CHO-CX3CR1, l'addition de CX3CL1 induit une phosphorylation rapide et transitoire de la protéine PKB (pic à 5min) (Kansra, Groves et al. 2001)
- PKB/NF-κB (Meucci, Fatatis et al. 2000)

Les cinétiques de ces phosphorylations sont toutefois très dépendantes du type cellulaire utilisé. A titre d'exemple, la phosphorylation de PKB est transitoire dans les CHO (5min) alors qu'elle persiste dans les neurones ou les HEK-CX3CR1, pendant respectivement 15 et 45min (Harrison, Jiang et al. 1998).

Certaines de ces voies sont inhibées après traitement des cellules par la PTX et/ou la CTX, alors que d'autres sont insensibles à ces traitements. Cela suggère l'existence de voies de signalisation indépendantes des protéines G_i et G_s , passant par d'autres protéines G comme les G_{12} ou G_{13} ou des voies indépendantes de toutes protéines G (cf. Chapitre I - § D.2).

C] Fonctions associées aux couples CX3CR1/CX3CL1

Comme toutes les chimiokines, le CX3CL1 soluble présente des propriétés chimio-attractantes essentielles au routage des cellules immunes. Il est donc capable de recruter sur son lieu de production les cellules exprimant le CX3CR1, parmi lesquelles les monocytes, les macrophages, la microglie, les cellules dendritiques ou encore certains lymphocytes. Une fois recrutées, ces cellules traversent la barrière endothéliale et pénètrent le tissu inflammé. Cette étape de transmigration est également orchestrée par le CX3CL1, mais sous sa forme membranaire cette fois. En effet, sous cette forme, le ligand agit comme une véritable molécule d'adhésion, capable d'arrêter les cellules CX3CR1⁺ circulantes et d'amorcer leur transmigration (Figure III-5).

C.1– Chimiotactisme

Dès la découverte de la chimiokine CX3CL1, plusieurs équipes indépendantes montrent que le surnageant de cellules HEK293 (**H**uman **E**mbryonic **K**idney) transfectées par le CX3CL1 est capable d'induire le chimiotactisme de monocytes et de lymphocytes T (Bazan, Bacon et al. 1997; Imai, Hieshima et al. 1997). Plus généralement, le CX3CL1 soluble induit la migration transendothéliale de leucocytes ou encore de cellules non-hématopoïétiques exprimant le CX3CR1, avec un effet maximal à une concentration de 1nM (Imai, Hieshima et al. 1997; Chapman, Moores et al. 2000). Dans le système nerveux central, il est intéressant de remarquer que les propriétés chimio-attractantes du CX3CL1 ne s'exercent pas sur l'ensemble des cellules CX3CR1⁺. En effet, alors que les cellules gliales répondent à l'attraction chimiotactique de CX3CL1, les astrocytes, malgré l'expression de CX3CR1 à leur surface, ne sont pas « attirés » par le CX3CL1. Pourtant dans les deux types cellulaires, une réponse calcique à CX3CL1 a été observée. Cette donnée confirme l'existence d'une multitude de voie de signalisation en aval du récepteur activé par son ligand et que le chimiotactisme ne semble pas être lié à la signalisation calcique mais plutôt à la voie de signalisation ERK1/2 et Syk (Gevrey, Isaac et al. 2005).

Il a également été décrit une synergie entre les différents couples chimiokine/récepteur en vue d'améliorer le chimiotactisme global. Par exemple, le CX3CL1 semble augmenter l'expression de CCL2 sur les monocytes, ce qui tend à améliorer le recrutement des monocytes sur le site de l'inflammation (Popovic, Laumonnier et al. 2008).

C.2- Adhésion cellulaire

C'est à l'occasion de l'identification du ligand de CX3CR1 que la fonction adhésive au couple CX3CL1/CX3CR1 a été mise en évidence. En effet une adhésion spécifique de différentes populations cellulaires CX3CR1⁺ (monocyte, lymphocytes T et neutrophiles) sur des cellules HEK293 exprimant de manière stable le CX3CL1 a été observée (Bazan, Bacon et al. 1997). Cette adhésion CX3CL1/CX3CR1 observée en adhésion statique (Imai, Hieshima et al. 1997) a ensuite été validée dans des conditions dynamiques, c'est-à-dire avec des cellules soumises à un flux (Fong, Robinson et al. 1998).

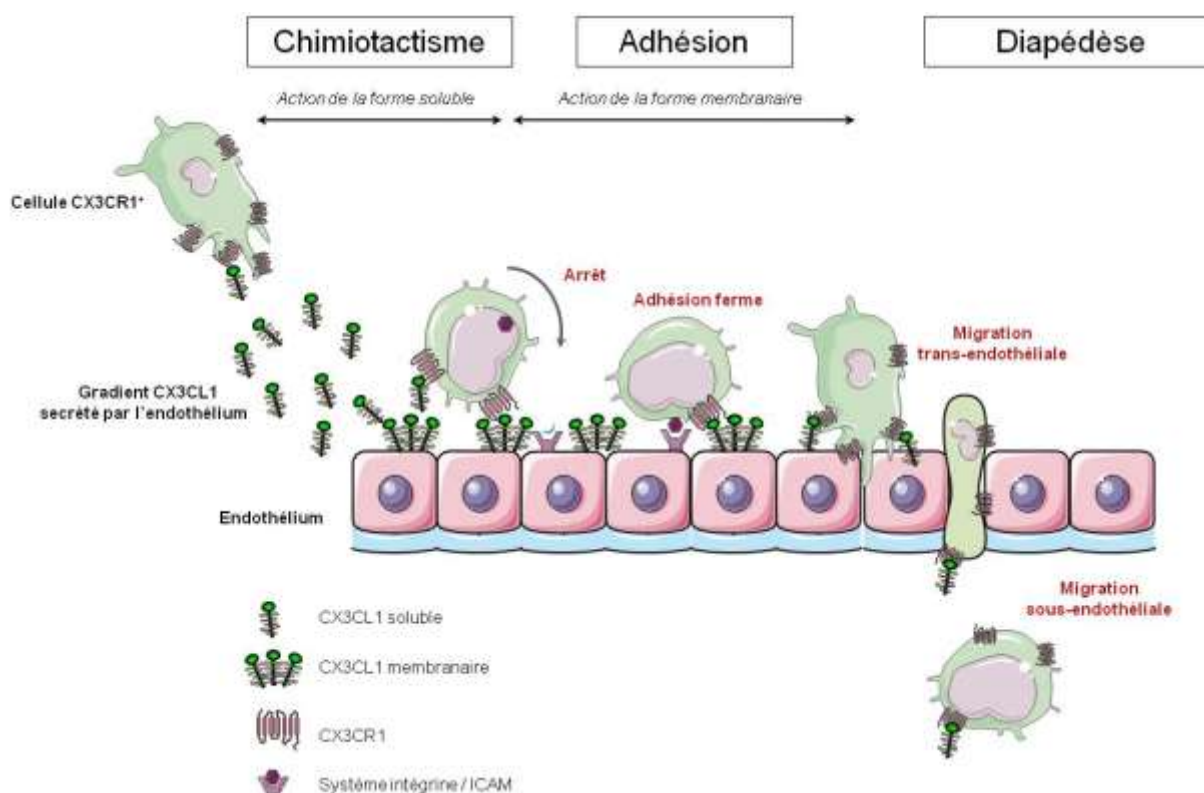


Figure III-5 : Coordination de l'action de la chimiokine soluble et membranaire lors du processus de recrutement leucocytaire.

Suite à un recrutement des cellules leucocytaires CX3CR1⁺ contrôlé par un gradient de CX3CL1 soluble, la forme membranaire de la chimiokine permet un arrêt du leucocyte sur les cellules endothéliales. La liaison entre le récepteur et la chimiokine induit une activation des systèmes intégrines à l'origine d'une adhésion ferme du leucocyte, nécessaire avant l'étape de transmigration.

Il est essentiel de noter que, du fait de la spécificité structurale du ligand, deux types d'adhésion cellulaires peuvent être associées à ce couple. La première est commune à l'ensemble des RCK et met en jeu les molécules d'adhésion classiques comme les intégrines (Figure III-6). Elle est conséquente à l'activation des intégrines en réponse à presque tous les RCK activés par leurs ligands. Le second type d'adhésion, qualifié d'intrinsèque ou de spécifique, est lié à l'existence de la forme membranaire qui agit comme une véritable molécule d'adhésion suffisante pour immobiliser les cellules exprimant le récepteur (Figure III-6). Cette seconde adhésion n'est possible que pour deux couples : CX3CL1/CX3CR1 et CXCL16/CXCR6. Les chimiokines solubles sont donc associées à une adhésion cellulaire par activation du système intégrine alors que les chimiokines présentant une forme membranaire activent les deux types d'adhésion.

C.2.1 – induite par la forme soluble

L'activation du CX3CR1 par son ligand soluble s'accompagne d'une augmentation de l'avidité des intégrines pour leurs ligands, ce qui conduit à une potentialisation de l'adhésion cellulaire comparé à un système pris individuellement (**Figure III-6**) (Umehara, Bloom et al. 2001). Parmi les systèmes intégrines couramment modulés par le CX3CL1, plusieurs études rapportent une augmentation de l'adhérence passant par les intégrine $\alpha 4 \beta 2$ (ou MAC-1) ou $\alpha 4 \beta 7$ (ou LPAM-1) (Haskell, Cleary et al. 1999; Goda, Imai et al. 2000; Kerfoot, Lord et al. 2003). Le détail de la signalisation conduisant à cette « suradhérence » par modulation du système intégrine est encore mal connu. Toutefois certaines études suggèrent l'implication de plusieurs voies de signalisation dont les voies syk/ERK, Src/p-38/MAPK et PI3K.

C.2.2 – induite par la forme membranaire

L'adhésion induite par la forme membranaire du ligand semble quant à elle indépendante de toute signalisation et ne semble n'être qu'un processus mécanique reposant sur l'affinité du ligand pour son récepteur. En effet, la mutation du motif DRY au niveau du récepteur, supposé impliqué dans la liaison du récepteur avec la protéine G, n'altère pas cette adhésion CX3CR1/CX3CL1 membranaire (Haskell, Cleary et al. 1999). De même que le signal calcique ne semble pas moduler cette réponse (Imai, Hieshima et al. 1997). Seule l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CX3CR1 (Imaizumi, Matsumiya et al. 2000) ou la pré-incubation des cellules CX3CR1⁺ avec la forme soluble du CX3CL1 (Goda, Imai et al. 2000) permettent d'abolir cette adhésion. Sous flux, l'adhésion de monocytes sur des cellules CX3CL1⁺, est observable sous des forces de cisaillement égales à 1.85 dyne/cm², comparable aux valeurs rencontrées dans la circulation veineuse (Fong, Robinson et al. 1998; Haskell, Cleary et al. 1999; Daoudi, Lavergne et al. 2004). Cette adhésion décroît à des forces de cisaillement égale à 10 dynes/cm², correspondant à des débits artériels (Kerfoot, Lord et al. 2003). La capture est rapide, les cellules CX3CR1⁺ s'immobilisent en 60 ms sur les cellules CX3CL1⁺ alors qu'il leur faut en moyenne 190 ms pour adhérer via les systèmes intégrines (Haskell, Cleary et al. 1999). Cette adhésion est également très solide, puisque une fois adhérente, même soumise à un flux plus important (>15 dynes/cm²), les cellules CX3CR1⁺ ne se détachent pas ou peu.

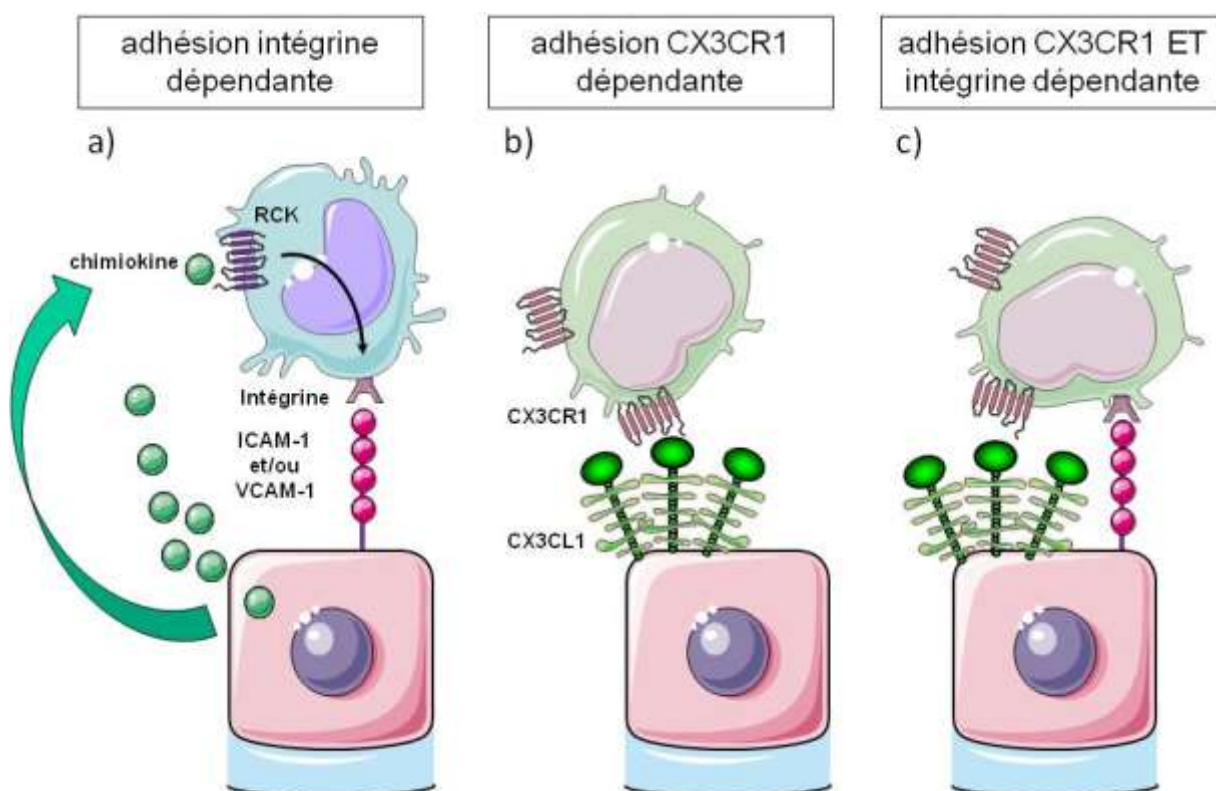


Figure III-6 : Trois configurations d'adhérence cellulaire induite par le système intégrine et ou le couple CX3CR1/CX3CL1 sur des cellules endothéliales.

- A- Adhésion cellulaire impliquant uniquement le système intégrine activé à la suite d'une libération dans le milieu extracellulaire de chimiokine soluble (CX3CL1, CCL2, ...) et dont les récepteurs respectifs se trouvent à la surface de la cellule « à adhérer»
- B- Adhésion cellulaire induite par la liaison du CX3CL1 membranaire situé à la surface de la cellule endothéliale et de son récepteur le CX3CR1 exprimé sur la cellule cible.
- C- Adhésion cellulaire synergique entre les deux systèmes précédents ; la liaison du CX3CL1 membranaire à son récepteur induit une activation du système d'adhésion intégrine dépendant.

C.2.3 – Corrélations fonctionnelles du polymorphisme génétique du CX3CR1

Il a été démontré au sein de notre équipe que la propriété adhésive du couple CX3CL1/CX3CR1 est différente selon le variant du récepteur. Des expériences d'adhésion sous flux ont permis de mettre en évidence une adhésion des cellules exprimant le variant CX3CR1-IM, sur le CX3CL1 membranaire, supérieure à celle observée sur les mêmes cellules exprimant le variant VT. Cette « sur-adhérence » est PTX sensible et corrèle avec une augmentation de la force d'adhérence entre les cellules CX3CR1-IM et le CX3CL1 membranaire (expériences de micromanipulations à deux pipettes) (Daoudi, Lavergne et al. 2004). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par une équipe américaine (McDermott, Fong et al. 2003). Pour cette équipe, le variant IM serait un récepteur déficient qui lierait moins bien le CX3CL1 et serait corrélé avec une réponse calcique, un chimiotactisme et une

adhérence sur CX3CL1 membranaire moins efficaces comparé au variant VT. La raison de ces résultats contradictoires reste encore à ce jour inconnue.

D] Physiologie du couple CX3CR1/CX3CL1

Le couple CX3CR1/CX3CL1 joue un rôle dans de nombreux processus biologiques dont la plupart sont aussi dépendants d'autres chimiokines et que nous avons décrits au cours du chapitre II (§ D). Nous expliciterons ici uniquement ceux dans lesquels le couple CX3CR1/CX3CL1 a un rôle central (Figure III-7).

D.1- Prolifération, différenciation et survie des cellules

Exemple des cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses (CML) humaines présentes au niveau des artères expriment le CX3CR1 et semblent être soumises au chimiotactisme CX3CL1 dépendant (Lucas, Bursill et al. 2003). Il a également été montré que le CX3CL1 exerçait un effet anti-apoptotique au sein de ces cellules tout en favorisant leur prolifération. Cette action du CX3CL1 passe par l'activation de la voie ERK1/2 en aval du CX3CR1 (White, Tan et al. 2010). Parallèlement, il a été démontré que le CX3CR1 était présent à la surface des progéniteurs de CML, des cellules mononuclées myéloïdes, qui peuvent être mobilisées et différenciées en CML à l'occasion d'une réparation post lésionnelle (Kumar, Metharom et al. 2010). Enfin, les CML sont capables aussi d'exprimer le CX3CL1 (Ollivier, Faure et al. 2003): l'action de cette chimiokine peut donc être autocrine.

D.2- Ostéoclastogenèse

Le tissu osseux est composé de cellules et d'une matrice extracellulaire qui, dans ce cas précis, est minéralisée. Il se renouvelle grâce à ses deux composantes cellulaires, à savoir les ostéoclastes qui dégradent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui la reconstruisent. Ces deux types cellulaires ne se trouvent pas au même endroit. Alors que les ostéoblastes sont à la surface du tissu osseux, les ostéoclastes eux se trouvent dans les cavités creusées dans l'os, le long des travées osseuses (appelées lacunes de Howship). Des études récentes mettent en évidence un rôle central du couple CX3CR1/CX3CL1 dans le processus d'ostéoclastogenèse. En effet, il avait été montré en 2009, que les ostéoclastes expriment le CX3CR1 à leur surface et peuvent être recrutés en réponse à une sécrétion de

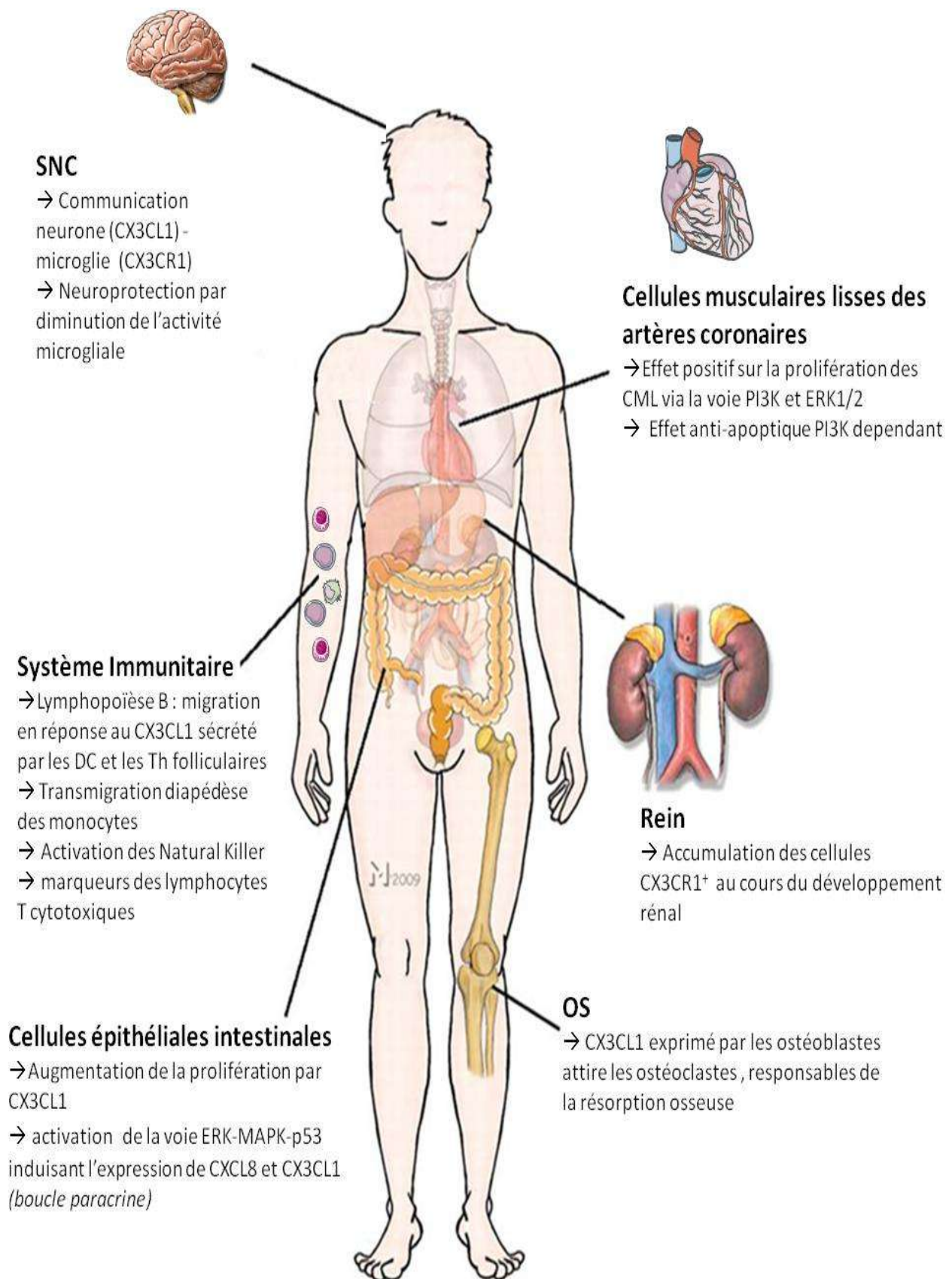


Figure III-7 : Principaux rôles physiologiques de l'axe CX3CL1/CX3CR1

CX3CL1 par les ostéoblastes (Koizumi, Saitoh et al. 2009). La forme membranaire du ligand contribue à leur adhésion. Une étude récente confirme cette observation et montre que la modulation du niveau d'expression du CX3CL1 permet de réguler l'ostéoclastogenèse (Han, Ryu et al. 2014). Dans cette étude, l'utilisation d'une souris déficiente pour le CX3CR1 ou traitée avec un anticorps bloquant anti-CX3CR1 favorise la reconstruction osseuse et prévient la résorption osseuse associée à l'irradiation des souris.

D.3- Réponses inflammatoire et immunitaire

L'augmentation de l'expression du CX3CL1 sur l'endothélium vasculaire constitue un signal d'alarme qui se traduit par le recrutement massif et spécifique des sous-populations leucocytaires exprimant le CX3CR1 (*lymphocytes T cytotoxiques, Natural Killer, monocytes,...*). Une fois recrutées, ces cellules sont vouées à envahir le tissu inflammé et doivent pour cela franchir la barrière endothéliale. Cette transmigration cellulaire est orchestrée par la seconde forme du CX3CL1, la forme membranaire. Cette forme permet dans un premier temps l'arrêt des cellules, puis leur diapédèse (Figure III-8) (Ancuta, Rao et al. 2003). Toutefois le rôle de cette forme membranaire ne semble pas se limiter à une fonction adhésive. En effet, elle est également capable d'induire une réponse cytotoxique dans les cellules recrutées. Les travaux de Nishimura et collaborateurs mettent bien en évidence cette action du CX3CL1 sur les NK (Nishimura, Umehara et al. 2002). Ils montrent que le CX3CL1 membranaire en plus d'être capable d'arrêter les NK au niveau du site de l'inflammation, d'activer ces cellules en provoquant leur dégranulation, ce qui à son tour est responsable d'un endommagement de l'endothélium. Parallèlement, on assiste à la sécrétion d'IFN- γ par les cellules infiltrées et donc à une activation des cellules endothéliales qui vont alors sécréter des chimiokines inflammatoires et surexprimer le CX3CL1 (Figure III-8). Cette surproduction de chimiokines à partir du compartiment sous-endothéliale contrôle le chimiotactisme et l'infiltration d'un surcroît de cellules immunes. Cette boucle paracrine permet de cette façon un maintien de la réponse immune et inflammatoire (Umehara, Bloom et al. 2004). La persistance excessive de cette réponse inflammatoire est souvent mise en cause dans de nombreuses pathologies chroniques telles que l'athérosclérose.

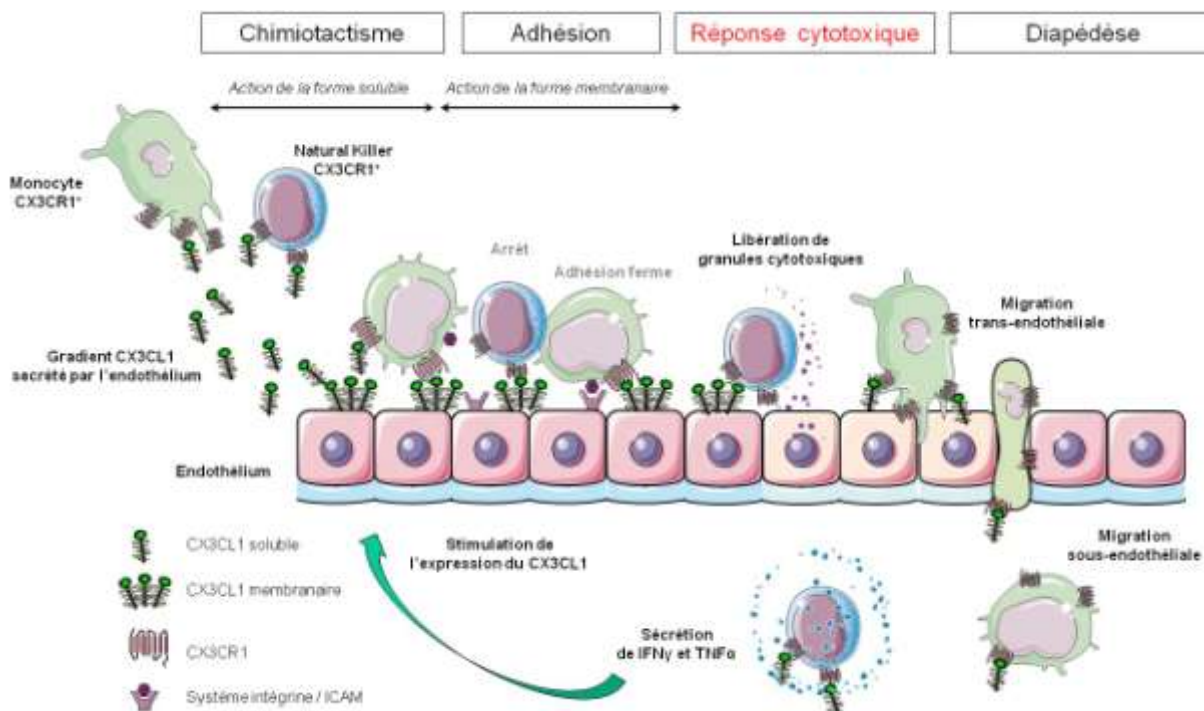


Figure III-8 : Boucle paracrine

Suite à son recrutement sous-endothélial (chimiotactisme et adhérence) hautement contrôlé par la chimiokine CX3CL1, le leucocyte sécrète des médiateurs de l'inflammation, tels que l'IFN- γ et le TNF- α . Ces cytokines inflammatoires stimulent l'expression de CX3CL1 par les cellules endothéliales et contribuent au renforcement du recrutement leucocytaire.

D.4- Rôle physiologique dans le système nerveux central CX3CL1, « signal off » de l'activation microgliale

CX3CL1 est une des chimiokines constitutivement exprimée à des niveaux élevés dans le système nerveux central. C'est d'ailleurs à partir de cellules endothéliales activées et de neurones qu'elle a été clonée (Bazan, Bacon et al. 1997). CX3CL1 et son récepteur jouent un rôle important dans la communication neurone-microglie. Alors que le CX3CL1 est présent à la surface des neurones, le CX3CR1 est exprimé par les cellules de la lignée myéloïde dont les cellules microgliales (Harrison, Jiang et al. 1998); (Hughes, Botham et al. 2002); (Lindia, McGowan et al. 2005). Cependant, CX3CL1 est également exprimé à la surface des astrocytes (Mizuno, Kawanokuchi et al. 2003), tandis que quelques études montrent l'expression neuronale de CX3CR1 (Meucci, Fatatis et al. 2000).

La voie de signalisation CX3CL1/CX3CR1 est impliqué dans la communication neurone-microglie et dans la neuroprotection en conditions inflammatoires ou lésionnelles (Harrison, Jiang et al. 1998; Boehme, Lio et al. 2000); (Zujovic, Benavides et al. 2000; Hughes, Botham et al. 2002); (Mizuno, Kawanokuchi et al. 2003); (Cardona, Pioro et al. 2006). En effet, des expériences in vitro et in vivo ont montré que l'interaction de CX3CL1 et de son

récepteur contribue à l'atténuation de l'activation microgliale et de la neurotoxicité en conditions inflammatoires. In vitro, le CX3CL1 soluble agit comme un facteur anti-inflammatoire via l'inhibition de la production induite par du LPS, de l'IL-1 β , l'IL-6, du TNF α , du NO (monoxyde d'azote) et de l'enzyme iNOS (NO synthase inductible) dans des cultures de cellules microgliales (Zujovic, Benavides et al. 2000; Mizuno, Kawanokuchi et al. 2003). En 2009, Lyons montre que les deux formes de CX3CL1 diminuent l'augmentation de l'expression d'IL-1 β et du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII) dans des cultures primaires neurones-microglie (Lyons, Lynch et al. 2009). In vivo, le blocage par un anticorps anti-CX3CL1 de l'action de la chimiokine endogène, potentialise la production induite par le LPS, de l'expression hippocampique de TNF α et de l'isoprostane-8 (marqueur de stress oxydatif), suggérant que l'expression de CX3CL1 est nécessaire au contrôle de l'activation microgliale (Zujovic, Schussler et al. 2001).

E] Physiopathologie du couple CX3CR1/CX3CL1

Il a été démontré que ce couple CX3CR1/CX3CL1 est impliqué dans la pathogénécité de plusieurs maladies, dont la pancréatite chronique (Yasuda, Ito et al. 2008; Ceyhan, Deucker et al. 2009), l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, la glomérulonéphrite, le SIDA (**S**yndrome d'**I**mmuno**D**éficienc**E** **A**cquis**E**), le rejet d'allogreffe (Haskell, Hancock et al. 2001), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Combadiere, Feumi et al. 2007), l'uvéïte (Chu, Li et al. 2009), la douleur neuropathique (Zhuang, Kawasaki et al. 2007), la septicémie, et divers types de cancer, comme le cancer du pancréas (Vitale, Cambien et al. 2007; Marchesi, Piemonti et al. 2008). Nous décrirons ici, de manière succincte, le rôle de CX3CL1/CX3CR1 et les conséquences du polymorphisme de CX3CR1 dans l'inflammation, l'athérosclérose, dans certaines pathologies cérébrales, dans certains cancers et dans l'infection VIH (**Figure III-9**).

E.1- Inflammation

Il est clairement démontré que l'axe CX3CL1/CX3CR1 est directement impliqué dans le recrutement, la migration et l'activation de cellules cytotoxiques du sang vers le tissu inflammé (Nishimura, Umehara et al. 2002) (Cf. chapitre II §.D.2). Plusieurs catégories de pathologies inflammatoires confirment cette hypothèse, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les réactions allergiques ou encore certaines pathologies auto-immunes.

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, il a été observé une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de CX3CL1 au niveau des muqueuses inflammées par comparaison avec la muqueuse du côlon sain. Cette surexpression de CX3CL1 semble être

induite par des cytokines pro-inflammatoires, en particulier par l'IL-8, ce qui suggère un impact important de cet axe CX3CL1/CX3CR1 dans l'inflammation intestinale (Brand, Hofbauer et al. 2006).

Le CX3CL1 a une influence déterminante sur l'issue de l'asthme allergique en augmentant le recrutement des éosinophiles dans les poumons (Bisset and Schmid-Grendelmeier 2005). Chez les patients atteints d'asthme ou de rhinite allergique, le niveau de CX3CL1 soluble est augmenté et la fonction cytotoxique dans les lymphocytes T naïfs (CD45RO⁻/CX3CR1⁺) et mémoires (CD45RO⁺ CD4⁺/CX3CR1⁺) circulants est augmentée (Rimaniol, Till et al. 2003). Après exposition à l'allergène, la concentration de CX3CL1 est augmentée dans le liquide broncho-alvéolaire de façon corrélée avec le nombre de cellules inflammatoires recrutées (Rimaniol, Till et al. 2003).

Le couple CX3CR1/CX3CL1 a été mis en cause dans un certain nombre de maladies auto-immunes dont la sclérose en plaque où le CX3CR1 est un marqueur de diagnostic : il existe une corrélation entre un pourcentage faible de cellules NK CX3CR1⁺ et la sévérité de la maladie.

E.2- Pathologie cardio-vasculaire sur fond d'inflammation

Exemple de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie cardio-vasculaire au cours de laquelle les chimiokines jouent un rôle crucial (cf. II.E-1). Plusieurs études ont montré que le CX3CL1 est un médiateur important de l'accumulation des leucocytes et de la migration des CML à l'intérieur de lésions athérosclérotiques (Lucas, Bursill et al. 2003; Apostolakis, Krambovitis et al. 2007; Galkina and Ley 2007; Saederup, Chan et al. 2008).

Les Lipoprotéines de petites densité (LDL) et l'acide linoléique oxydés stimulent l'expression du CX3CL1 au niveau des CML, ce qui induit une augmentation de l'adhésion des macrophages CX3CR1⁺, qui eux même stimulent l'expression de CX3CL1 par les CML, générant ainsi une boucle de régulation autocrine et une amplification du recrutement et de l'adhésion des macrophages et de leur infiltration au niveau de la plaque d'athérome (Barlic and Murphy 2007; Barlic, Zhang et al. 2007)

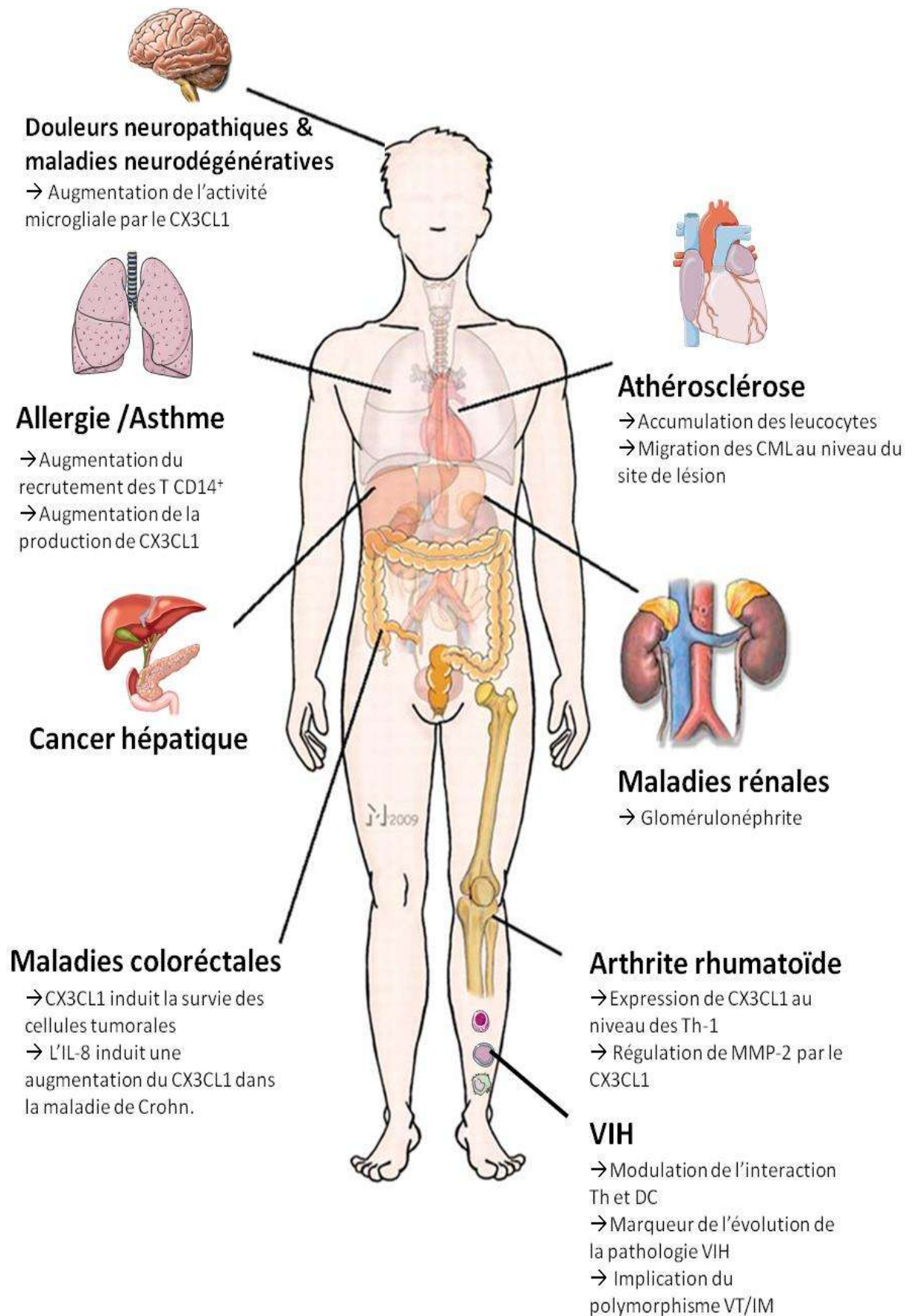


Figure III-9 : Implication de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans différentes pathologies

Une diminution de la formation de lésions d'athérosclérose a été signalée chez des souris double knock-out CX3CR1/apolipoprotéine E (Combadière, Potteaux et al. 2003). Mais il semble que ce couple CX3CR1/CX3CL1 intervient à plusieurs niveaux du développement de la maladie. La chimiokine CX3CL1 peut également contribuer au dysfonctionnement vasculaire par un autre mécanisme, en stimulant la génération d'anions superoxydes produit par les cellules endothéliales et les CML. Enfin, le CX3CL1 sous sa forme soluble induit une dégranulation des plaquettes et l'expression à leur surface de P-Selectine, ce qui stimule l'adhésion et l'accumulation des leucocytes.

Le polymorphisme CX3CR1 a été identifié comme un des facteurs de risque des maladies coronariennes chez les patients, indépendamment d'autres facteurs de risque, plus classiques (*surpoids, tabac,...*). Ce polymorphisme du récepteur CX3CR1 semble impliqué dans une adhésion différentielle des leucocytes, conférant à ce variant IM des propriétés de protection contre les maladies cardio-vasculaires (Combadière, Potteaux et al. 2003). Il a ainsi été démontré que l'allèle I249 est associé à une meilleure vasodilatation (McDermott, Halcox et al. 2001) et est décrite comme un facteur de stabilité des plaques d'athérome, alors que l'allèle M280 semble être un facteur génétique protecteur de l'obstruction de l'artère carotide (Ghilardi, Biondi et al. 2004). Cependant les mécanismes de cette protection ne sont pas totalement élucidés. Umehara et collaborateurs proposent un modèle où l'expression de la forme membranaire du CX3CL1 à la surface des cellules endothéliales est à l'origine d'une augmentation de l'adhésion des monocytes CX3CR1-IM qui empêche leur transmigration et donc limite l'enrichissement de la plaque d'athérome (Umehara, Bloom et al. 2004).

L'axe CX3CL1-CX3CR1 représente une cible thérapeutique très intéressante dans la maladie de l'athérosclérose et son exploration est susceptible d'ouvrir la voie à des essais cliniques dans la recherche cardiovasculaire dans un proche avenir (Poupel, Boissonnas et al. 2013).

E.3- pathologies cérébrales

E.3.1 – Douleur

Le couple CX3CL1/CX3CR1 occupe une place importante dans le processus de communication microglie-neurone (Nishiyori, Minami et al. 1998). Suite à une stimulation, les neurones sensoriels afférents sont capables de cliver le CX3CL1 membranaire et ainsi de libérer de la chimiokine soluble (Milligan, Zapata et al. 2004). Dans plusieurs modèles expérimentaux de douleurs neuropathiques, il a été observé une augmentation de la libération de CX3CL1 par les neurones de la corne dorsale (Milligan, Sloane et al. 2008). Cette

libération massive de CX3CL1 active la voie p-38-MAPK en aval du CX3CR1 et engendre une libération de cytokines neuropathiques. Ce mécanisme contribuerait au maintien et à l'amplification de la douleur chronique (Clark, Yip et al. 2009). L'utilisation d'anticorps bloquants dans un modèle de douleur lié au cancer du tibia chez le rat, permet de retarder et d'atténuer la douleur, sans avoir d'effets sur le développement tumoral (Yin, Cheng et al. 2010).

E.3.2 –Maladies neurodégénératives

Un nouvel axe de recherche tend à expliciter l'implication du couple CX3CL1/CX3CR1 dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Dans ces deux neuropathologies, le CX3CL1 tient un rôle central du fait qu'il constitue une des molécules clé de la communication neurone-microglie. Ainsi il a été observé une diminution des dépôts β -amyloïde et une diminution significative de la perte neuronale dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer déficient en CX3CR1. Cet effet est certainement lié à une diminution de l'activité cytotoxique des cellules microgliales (Fuhrmann, Bittner et al. 2010; Lee, Varvel et al. 2010). Ces données sont également observées sur un modèle de la maladie de Parkinson, où l'activation de la microglie est là encore responsable de la dégénérescence neuronale (Shan, Hong-Min et al. 2011).

Enfin l'axe CX3CR1/CX3CL1 s'illustre dans l'évolution de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Au sein du laboratoire, l'équipe a pu démontrer une implication des cellules microgliales CX3CR1⁺. Chez des patients atteints de DMLA, ces cellules s'accumulent au niveau de l'espace sous-rétinien à proximité des photorécepteurs alors que chez le sujet sain, ces cellules sont localisées dans la rétine interne. Après une phagocytose excessive des photorécepteurs, les cellules microgliales s'agrègent, obstruant la vision des patients. Ces cellules microgliales ont également des propriétés angiogéniques, VEGF dépendantes, responsables d'une destruction de la rétine et d'une dégénérescence maculaire par sécrétion de facteurs neurotoxiques (Combadiere, Feumi et al. 2007). Dans 20% des cas, on observe une augmentation significative du développement de nouveaux vaisseaux sanguins, on parle alors de DMLA exsudative ou DMLA sèche (Figure III-10). Au vu de ces observations, il semble que le CX3CR1 soit impliqué, dans le SNC, dans l'évacuation des cellules microgliales alors que dans les autres organes, il participe à un recrutement. Une inactivation du CX3CR1 permet de simuler ce dysfonctionnement chez l'animal avec notamment une accumulation de cellules microgliales dans l'espace sous-rétinien.

De manière cohérente avec le modèle murin, il a été montré que le risque de DMLA chez l'Homme est environ 2 à 2.5 fois supérieur chez les individus homozygotes porteurs de l'allèle M280 (Combadiere, Feumi et al. 2007).

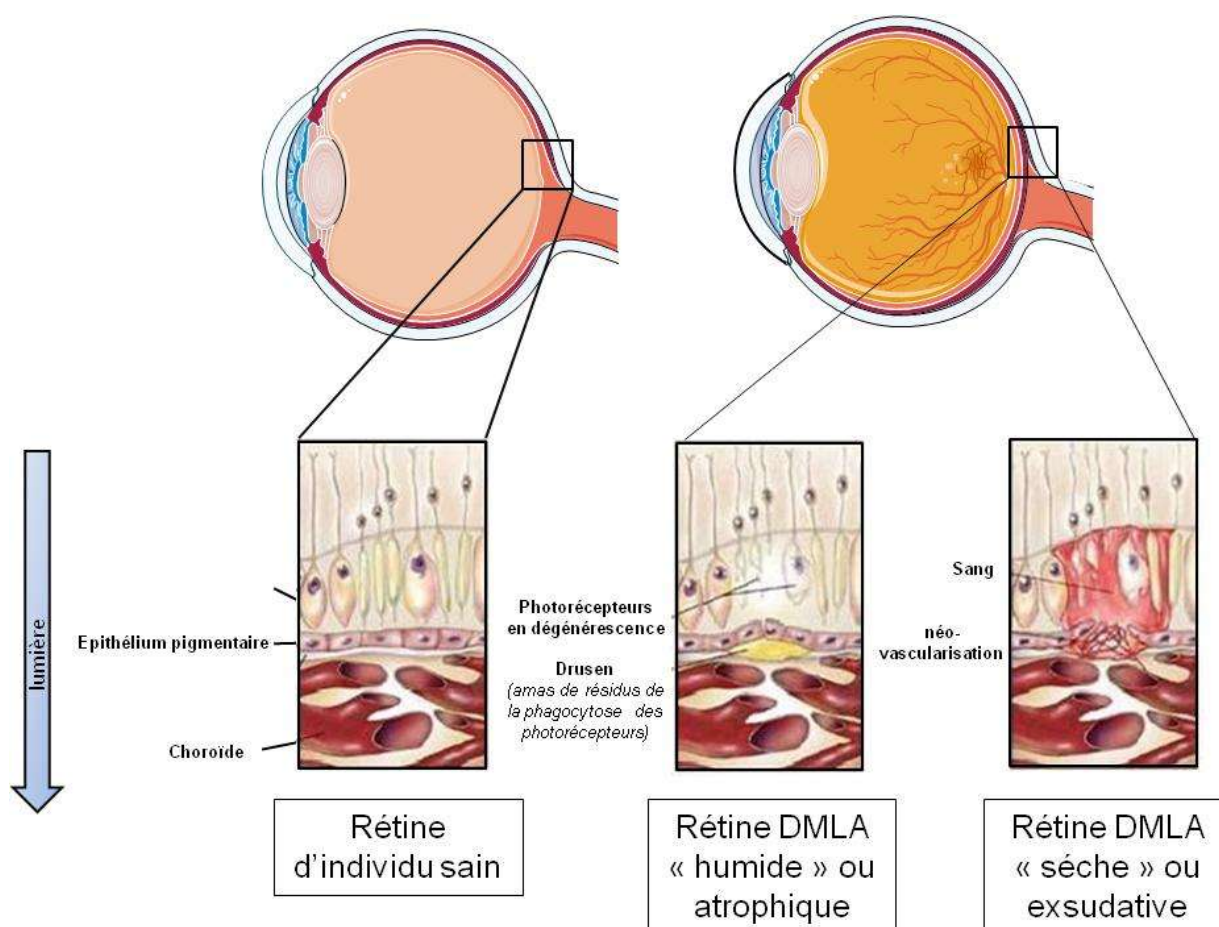


Figure III-10 : Représentation schématique de la configuration rétinienne chez un individu sain et un patient atteint de DMLA

E.4- CX3CL1 et Cancer

La mise en place d'une réponse immunitaire efficace est un paramètre critique dans le processus d'apparition des tumeurs et d'inhibition de la dissémination métastatique. On sait que CX3CL1 et CX3CR1 sont des acteurs importants de l'immunité en particulier pour leurs effets sur les cellules NK, les monocytes ou encore les lymphocytes T cytotoxiques. Ainsi leur dysfonctionnement est souvent associé dans des pathologies où la réponse immunitaire fait défaut, c'est notamment le cas du cancer. Il s'agit également de la pathologie où l'utilisation de CX3CL1 en tant qu'agent thérapeutique est la plus prometteuse. En effet, l'administration de CX3CL1 à des souris présentant des carcinomes pulmonaires induit un effet anti-tumoral grâce principalement à un recrutement massif de cellules cytotoxiques, telles que les NK (Guo, Chen et al. 2003; Guo, Zhang et al. 2003) et les lymphocytes T (Lavergne, Combadiere et al. 2003; Xin, Kikuchi et al. 2005).

Certaines études mettent en évidence un recrutement supplémentaire des DC, impliquées dans l'inhibition de la croissance de certains mélanomes et de tumeurs colorectales chez la souris (Nukiwa, Andarini et al. 2006). Dans ce cas, le couple CX3CR1/CX3CL1 est décrit comme anti-tumoral. Selon le modèle étudié, cet effet anti-tumoral ne dépend pas toujours des mêmes cellules immunes mais aboutit aux mêmes conséquences, à savoir une inhibition partielle mais efficace de la croissance des cellules tumorales mais également une diminution de leur survie. Ces résultats ont été observés dans différents modèles et par des équipes indépendantes.

En revanche, dans d'autres exemples de cancer, le CX3CL1 a été associé à un effet pro-tumoral, responsable d'une augmentation du potentiel métastatique et d'un risque de récurrence locale (Andre, Cabioglu et al. 2006; Marchesi, Piemonti et al. 2008). Les mécanismes de ces effets contradictoires du CX3CL1 ne sont pas encore pleinement compris. Bien que l'effet anti-tumoral soit probablement causé par des mécanismes immunologiques, les effets pro-tumoraux peuvent être expliqués par les propriétés adhésives et de facilitation de la transmigration des cellules cancéreuses (Jamieson, Shimizu et al. 2008; Nevo, Sagi-Assif et al. 2009). Le CX3CL1 peut également provoquer un effet pro-tumoral en induisant l'angiogenèse. Chez des patients présentant un cancer colorectal, l'expression de CX3CL1 corrèle avec une augmentation de la densité de cellules tumorales infiltrantes (Ohta, Tanaka et al. 2005). Le CX3CL1 est d'ailleurs utilisé comme biomarqueur du pronostic, utile pour identifier les patients qui pourraient bénéficier d'une thérapie immunomodulatrice complémentaire.

Ce couple CX3CR1/CX3CL1 est également responsable de la dissémination métastatique selon un mécanisme simple qui repose sur le recrutement des cellules cancéreuses CX3CR1⁺ à partir du foyer tumoral primaire, sous l'influence de la forme soluble du ligand, suivi de l'infiltration dans un foyer tumoral secondaire. Cette étape est notamment contrôlée par la forme membranaire du CX3CL1. Cependant les deux formes du CX3CL1 n'ont pas toujours des effets comparables. En effet, dans certains cancers, dont celui du colon, une étude montre qu'à l'inverse de la forme soluble qui présente un effet anti-tumoral par action sur la dissémination métastatique, la forme membranaire a une action pro-tumorale (Vitale, Cambien et al. 2007). Cette étude souligne l'importance de la régulation de l'équilibre entre les formes solubles et transmembranaires du CX3CL1.

E.5- CX3CL1 et VIH

Initialement identifié comme un des corécepteurs du VIH avec le CXCR4 et le CCR5, les études *in vivo* ont toutefois écarté l'implication directe du CX3CR1 dans le processus d'infection des cellules, montrant que sa présence n'était pas indispensable (Garin, Tarantino et al. 2003). Cependant, en dehors d'un rôle de corécepteur, le CX3CR1 est bien impliqué au cours de l'infection virale (Becker 2007). Il a ainsi été montré que les niveaux d'expression de CX3CL1 et CX3CR1 sont modifiés au cours de l'infection, ce qui se traduit par une modulation de l'interaction des lymphocytes T et des DC (Faure, Meyer et al. 2000; Foussat, Bouchet-Delbos et al. 2001). De même, l'expression de CX3CL1 augmente au niveau des DC matures dans les zones T des ganglions lymphatiques (Foussat, Bouchet-Delbos et al. 2001). Cette forte expression de CX3CL1 aurait pour but de consolider l'interaction adhésive des DC avec les lymphocytes pour une présentation antigénique meilleure et plus efficace. On observe également une augmentation de l'expression de CX3CL1 lors du contact cellules microgliales-macrophages infectés par le VIH, ce qui pourrait entraîner le recrutement massif de monocytes dans le parenchyme cérébral (Pereira, Middel et al. 2001). Il a été montré qu'il y avait une corrélation entre la progression de la pathologie et le fait que le CX3CR1 devienne le principal RCK exprimé par les T CD4⁺ et T CD8⁺ effecteurs cytotoxiques mémoires (Combadiere, Faure et al. 2003). Le CX3CR1 contrôle également la migration et les propriétés antivirales des lymphocytes T8 en inhibant par exemple la production d'IFN- γ (Combadiere, Faure et al. 2003). Le CX3CR1 serait donc un bon marqueur de l'évolution de la pathologie VIH.

Une étude menée au sein du laboratoire, montre que la présence des variants V249I et T280M du CX3CR1 chez des patients infectés par le VIH est corrélée avec une évolution plus rapide de la pathologie vers le stade SIDA (Faure, Meyer et al. 2000). Cette étude épidémiologique révèle que le CX3CR1 semble ne pas avoir la même fonctionnalité suivant qu'il est muté ou non. De plus, l'haplotype I249-M280 exprimé à l'état homozygote est associé à une diminution du taux de fixation de CX3CL1 à son récepteur présent sur les lymphocytes périphériques de ces mêmes patients. Cette diminution peut être expliquée soit par la diminution de l'affinité du variant CX3CR1-M280 vis-à-vis du CX3CL1 soluble (mais les études biochimiques ne vont pas dans ce sens) soit par une diminution de l'expression du récepteur à la membrane lors de l'infection (Faure, Meyer et al. 2000). La perte fonctionnelle du CX3CR1 muté pourrait être responsable de la diminution de la survie. Toutefois, ces résultats divergent en fonction des cohortes utilisées. A l'inverse, une étude américaine a associé la variation T280M, même à l'état hétérozygote, avec une progression retardée de la maladie. Cette régression est expliquée par la diminution de l'activité de corécepteur du CX3CR1-IM

(McDermott, Halcox et al. 2001), diminution qui est une nouvelle fois en contradiction avec les résultats de notre laboratoire. Une étude sur une cohorte espagnole a associé l'haplotype I249 – T280 aux LTNP (**L**ong **T**erm **N**on-**P**rogressors) [Vidal et al. 2005]. D'un autre côté, les résultats de la toute première étude effectuée au sein du laboratoire ont été confirmés depuis (Faure, Meyer et al. 2003; Singh, Hughes et al. 2005). Il n'y a par ailleurs pas d'association entre le polymorphisme de la région non traduite 3'UTR du CX3CR1 et la progression de la maladie (Peraire, Vidal et al. 2007)

La présence de la mutation I249 de CX3CR1 a été corrélée à un échec plus précoce de la trithérapie anti-VIH suggérant, là encore, un rôle du couple CX3CR1/CX3CL1 au cours de la réponse immune antivirale spécifique du VIH (Brumme, Dong et al. 2003). Par contre, plus récemment, les allèles I249 et M280 ont été associés à une meilleure réponse immunologique au traitement HAART (**H**ighly **A**ctive **A**ntiretroviral **T**herapy) (Passam, Sourvinos et al. 2007).

IV. AMP cyclique & Immunité : ami ou ennemi ?

La survie d'une cellule dépend de sa capacité à intégrer les différents signaux de son environnement et à s'y conformer en mettant en place une réponse cellulaire adaptée (cf. chapitre I - § A). La réponse cellulaire résulte de l'activation en aval de ces récepteurs d'une multitude de voies de signalisation mettant en jeu des molécules intracellulaires qualifiées de messagers secondaires. Ces molécules sont de véritables carrefours entre les différentes voies de signalisations activées. La nature de ces messagers secondaires est multiple. Il peut s'agir d'ions comme le calcium, de phospholipides comme le PIP2 ou le DAG, ainsi que de nucléotides cycliques: GMPc ou AMPc. C'est à ce dernier que nous nous sommes intéressé puisqu'il constitue un messenger classiquement modulé en aval des RCK.

Plusieurs études mettent en évidence le rôle immunosuppresseur de l'AMPc. Cette immunosuppression passe par une modulation de plusieurs processus dont le recrutement et l'adhésion des leucocytes, la production de médiateurs inflammatoires, la phagocytose produite par les cellules immunes spécialisées (*monocyte, macrophage et lymphocyte T et B*) ou encore par l'inhibition du récepteur à l'antigène présent à la surface des lymphocytes. Par ailleurs, plusieurs situations cliniques qui prédisposent à l'infection ont été associées à une augmentation de la concentration d'AMPc : ainsi de nombreuses stratégies thérapeutiques ont pour but de diminuer cette production d'AMPc afin de restaurer une réponse immunitaire efficace.

Après une rapide description du système AMPc, nous expliciterons l'aspect immunorégulateur de ce messenger secondaire.

A] Anatomie du système AMPc

A.1- Effecteurs et voies de signalisation

La voie de signalisation AMPc est induite en aval de nombreux récepteurs et particulièrement en aval des RCPG dont font partie les RCK. Le niveau d'AMPc intracellulaire est principalement commandé par deux types d'enzymes, celles impliquées dans la synthèse : les AC et celles responsables de sa dégradation : les phosphodiésterases (PDE).

Il existe dix isoformes différentes de l'AC (AC1-AC10) et onze isoformes de PDE (PDE1-PDE11). Neuf des AC sont des protéines membranaires, attachées à la face interne de la membrane alors que la dixième (AC10) est décrite comme soluble (cf. chapitre I - § B.5.1). Pour rappel, ces

enzymes transforment l'ATP en AMPc et sont contrôlées en amont par les sous unités α de la protéine G_s et G_i : α_i inhibe l'activité AC alors que α_s l'active. En revanche les PDE sont le plus souvent des protéines cytoplasmiques, responsables de l'hydrolyse de l'AMPc en adénosine 5' monophosphate (AMP) et pyrophosphate (PPi). Ayant déjà décrit les AC au cours du chapitre I, nous consacrerons ici un paragraphe aux PDE ainsi qu'aux principaux effecteurs de l'AMPc.

A.1.1 – Les Phosphodiésterases (PDE)

Les PDE sont les enzymes responsables de l'hydrolyse des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc). Bien que dans certaines cellules comme les cardiomyocytes, l'AMPc peut être transporté hors de la cellule par des canaux de la famille des MRP (Multidrug Resistance Protein), l'activité catalytique des PDE constitue la seule voie d'élimination de l'AMPc dans la plupart des types cellulaires. C'est principalement l'activité des PDE qui va apporter une dimension spatio-temporelle du signal AMPc.

Décrite pour la première fois en 1962 par Butcher et Sutherland (Butcher and Sutherland 1962), la superfamille des PDE contient actuellement plus de 90 membres regroupés en 11 familles selon leurs propriétés structurales, enzymatiques, pharmacologiques ainsi que leur mode de régulation (**Tableau IV.1**). Chaque famille est codée par 1 à 4 gènes qui peuvent subir des épissages alternatifs, ce qui explique les 96 PDE recensées. Une nomenclature a été proposée afin de classer les différents isoformes, on peut ainsi identifier la famille de PDE, le gène codant pour l'isoforme ainsi que l'épissage alternatif. A titre d'exemple la PDE4D3 correspond à la PDE de la famille 4, codée par le gène D et produite par le 3^{ème} épissage alternatif de l'ARN issu de ce même gène.

Les PDE des familles 4,7 et 8 sont capables de dégrader sélectivement l'AMPc, alors que les isoformes de la famille 5, 6 et 9 sont spécifique du GMPc. Les familles 1, 2, 3,10 et 1 peuvent hydrolyser les deux nucléotides cycliques indifféremment (**Figure IV-1**).

D'un point de vue structure, les PDE partagent une organisation structurale commune contenant : un domaine catalytique conservé d'une famille à l'autre et situé à l'extrémité C-terminale et des domaines de régulation et d'adressage situés essentiellement dans la partie N-terminale. La plupart des PDE fonctionnent en dimère ou oligomère (Conti and Beavo 2007).












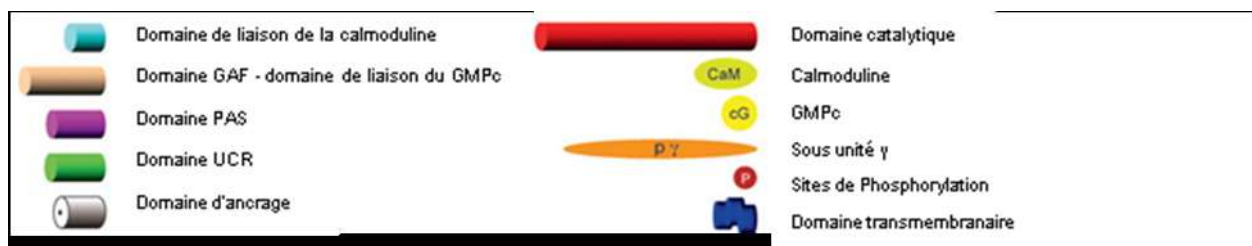
<i>PDE</i>	<i>Gènes / Substrat</i>	<i>Localité Tissulaire</i>	<i>Site de liaison / phosphorylation</i>
	1 PDE1A – GMPc PDE1B – GMPc PDE1C – AMPc et GMPc	Cœur, cerveau, muscle lisse, poumons, lymphocytes T	Ca ²⁺ /CaM PKA
	2 PDE2A – AMPc et (1-3) GMPc	Glandes surrénales, cœur, foie, poumons, plaquettes	GMPc
	3 PDE3A – AMPc > (1-3) GMPc PDE3B – AMPc > GMPc	Cœur, poumons, foie, reins, adipocytes, lymphocytes T, cellules inflammatoires, plaquettes	PKA et PKB
	4 PDE4A PDE4B PDE4C PDE4D	Reins, cerveau, foie, poumons, muscle lisses, cardiomyocytes, cellules inflammatoires,	PKA
	5 PDE5A – GMPc	Poumons, plaquettes, vaisseaux, muscle lisses	
	6 PDE6A – GMPc PDE6B – GMPc	Photorecepteurs	transducine
	7 PDE7A – AMPc PDE7B – AMPc	Muscles, cœur, reins, pancréas, lymphocytes T, éosinophiles, neutrophiles	
	8 PDE8A – AMPc PDE8B – AMPc	Testicules, œil, foie, muscles, rein, ovaires, cerveau, lymphocytes T	
	9 PDE9A – GMPc	Rein, foie, poumons, cerveau, rate, intestins	
	10 PDE10A – AMPc < GMPc	Testicules, cerveau	
	11 PDE11A – AMPc et GMPc	Muscles, prostate, rein, foie, testicules,	

Tableau IV.1 : Classification des PDE (D'après Ishiwata et al.2007, Smith et al. 2004 ; van der staay et al. 2008)

Légendes tableau IV.1 :



A.1.2 – Effecteurs de l'AMPc

Parallèlement à la voie canonique impliquant la PKA comme principal effecteur, deux autres effecteurs de cette voie ont été décrits. Il s'agit de la protéine EPAC ainsi que des canaux ioniques CNG et HCN. Ensemble ou séparément, ces différentes branches de la signalisation AMPc, tendent à moduler différentes fonctions cellulaires.

La Protéine Kinase A (PKA)

A l'état inactif, la PKA est un hétérotétramère formé de 4 sous-unités : 2 sous-unités catalytiques (C) et 2 sous-unités régulatrices (R). L'AMPc en se liant aux sous-unités R, dissocie et libère les sous-unités C qui deviennent actives (Figure IV-1). Les sous-unités C de la PKA ont pour fonction de phosphoryler les protéines cibles au niveau d'un motif dont la séquence est formée de deux aa basiques, suivi d'un aa neutre puis d'une sérine ou d'une thréonine phosphorylable : RRXS/T. L'ATP est ici le donneur de phosphate et d'énergie.

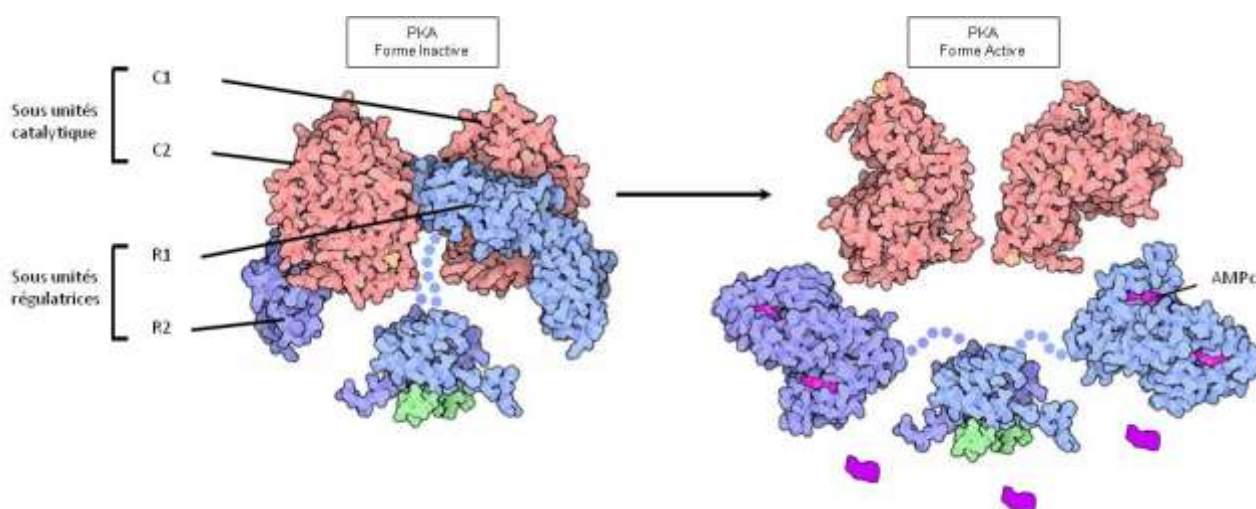


Figure IV-1 : Représentation schématique de la Protéine Kinase A

La PKA est l'une des protéines cible de l'AMPc. Elle se compose de 4 sous-unités : 2 sous-unités catalytiques et 2 sous-unités régulatrices. A l'état basal, ces 4 sous-unités sont cohésives. Lorsque l'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices, on assiste à la libération des sous-unités catalytiques qui vont aller phosphoryler tout un tas de protéines cibles.

Initialement, deux isoformes de la PKA (I et II) avaient été décrites en fonction de leur profil d'élution sur colonne DEAE (**Di**Ethyl**Amino**Ethyl). Ces deux isoformes diffèrent par leur domaines régulateurs annotés respectivement RI et RII, présentant une affinité différente pour l'AMPc. Il a récemment été démontré qu'il existe bien plus de deux PKA. Cette hétérogénéité résulte de l'existence de différents variants et sous variants, issus d'épissages alternatifs, des régions régulatrices (RI α et β / RII α et β) comme catalytiques (C α , β et γ).

L'activité catalytique de la PKA est régulée par un inhibiteur endogène, PKI (**P**rotéine **K**inase **I**nhibitor). Ce dernier présente une forte affinité pour les sous unités catalytiques de la PKA, qu'il lie au niveau du site catalytique. Certaines études tendent à démontrer que ce facteur, en plus de son rôle d'inhibiteur de la PKA, contribue à la translocation de la PKA active du compartiment nucléaire (où se trouvent certaines protéines cibles) vers le cytoplasme où elle redevient inactive après liaison avec les sous unités régulatrices.

Il y a plus de 100 protéines substrats de la PKA, parmi lesquelles NFAT, Raf-1, Ras ou encore d'autres effecteurs de la voie MAPK. Certaines de ces protéines sont activées, d'autres sont au contraire inhibées par la phosphorylation.

Une interconnexion de la voie AMPc/PKA avec la signalisation calcique a également été rapportée (Rogue, Humbert et al. 1998) ainsi qu'avec la voie PKB (Du and Montminy 1998). Dans les cellules immunes, il semble également possible que la PKA inhibe la voie JaK/STAT (David, Petricoin et al. 1996).

Le facteur d'échange EPAC

En 1998, deux groupes indépendants mettent en évidence une nouvelle famille de protéines liant l'AMPc : EPAC (**E**xchange **P**rotein directly **A**ctivated by **c**AMP) (de Rooij, Zwartkuis et al. 1998; Kawasaki, Springett et al. 1998). Ces protéines contiennent un domaine de liaison pour l'AMPc (CBD : **c**AMP **B**inding **D**omain) qui est homologue à celui des sous-unités régulatrices de la PKA. L'AMPc se lie à la protéine EPAC avec une haute affinité, ce qui active la famille des petites GTPases Ras : Rap1 et Rap2. EPAC est en effet un facteur d'échange (GEF) qui entraîne l'échange du GDP en GTP sur ces petites protéines G ou ras (Bos 2003), permettant ainsi leur activation et leur interaction avec leurs effecteurs (**Figure IV-2.B**).

Il existe deux isoformes d'EPAC : Epac1 et Epac2, produits de gènes indépendants chez les mammifères. Alors qu'Epac1 est exprimé de manière ubiquitaire, Epac2 présente une expression confinée à certains tissus (de Rooij, Zwartkuis et al. 1998; Kawasaki, Springett et al. 1998). Ces deux isoformes présentent une importante homologie de séquence et contiennent

toutes les deux une région N-terminale régulatrice comprenant un domaine d'adressage (DEP : Dishevelled Egl-10 Pleckstrin); des domaines de liaison de l'AMPc (CBD) et une région C-terminale catalytique. La région catalytique d'Epac1 se compose d'un motif d'échange RAS (REM), un domaine d'association RAS (RA) et du domaine classique d'homologie CDC25 (CDC25HD) responsable de l'activité d'échange des nucléotides (Figure IV-2.A).

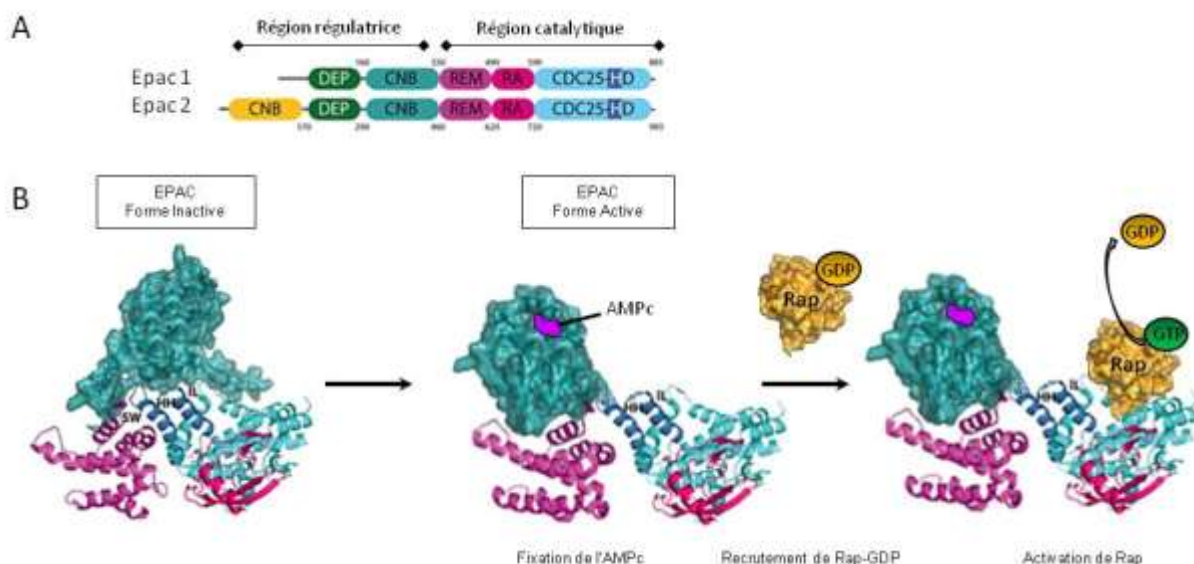


Figure IV-2 : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines EPAC.

A- Structure des protéines EPAC (D'après Gloerich et Bos, 2010) DEP : Dishevelled, Eg10 and Pleckstrin ; CNB : cAMP Binding Domain, REM : Ras Exchange Motif ; RA : Ras Association Domain, CDC25HD : CDC25 Homology Domain.

B- Mécanisme d'activation de la protéine EPAC.

La découverte de la protéine EPAC comme nouvelle cible intracellulaire de l'AMPc suggère que le mécanisme de signalisation de l'AMPc est beaucoup plus complexe que ce que l'on croyait auparavant. Ainsi, une grande partie des effets induit par l'AMPc, qui étaient attribués à la seule action de la PKA, sont en partie imputables à EPAC et n'implique pas la branche PKA de la voie AMPc. A ce jour, il a été démontré que la protéine EPAC est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires telles que l'adhésion cellulaire (Rangarajan, Enserink et al. 2003; Enserink, Price et al. 2004), les jonctions cellule-cellule (Cullere, Shaw et al. 2005), l'exocytose et la sécrétion (Ozaki, Shibasaki et al. 2000), la différenciation (Geissmann, Jung et al. 2003) et la prolifération cellulaire (Métrich, Lucas et al. 2008).

Les canaux régulés par les nucléotides cycliques : CNG et HCN

Les canaux régulés par les nucléotides cycliques sont les seuls effecteurs de l'AMPc dont l'activation produit des variations de la concentration ionique et du potentiel membranaire. Il existe

deux grandes familles de canaux régulés par les nucléotides cycliques : les canaux CNG (**C**yclic **N**ucleotide **G**ated channel) et les canaux HCN (**H**yperpolarization-activated **C**yclic **N**ucleotide gated). Ces deux familles partagent la même organisation structurale (Figure IV-3.A). Ils sont formés par l'assemblage de :

- 4 sous unités, constituées chacune de 6 segments transmembranaires (S1-S6),
- une boucle P située entre S5 et S6 formant le pore du canal
- un domaine de liaison aux nucléotides cycliques situé dans la région C-terminale.

Ces deux familles de canaux diffèrent par leur mode d'activation, leur perméabilité ionique et la liaison de l'AMPc et du GMPc.

Les canaux CNG sont exprimés principalement dans les photorécepteurs de la rétine et les neurones olfactifs. Les formes fonctionnelles sont des hétérotétramères composés de deux sous unité α et deux sous unité β (Kaupp and Seifert 2002). L'ouverture de ces canaux est contrôlée aussi bien par la liaison d'une molécule d'AMPc comme d'un GMPc. Lors de la fixation de l'un de ces deux nucléotides cyclique, le pore du canal devient perméant au calcium et aux cations monovalents. Ainsi l'ouverture de ce canal induit une dépolarisation de la membrane plasmique de la cellule conduisant à une entrée massive d'ions calcium (Figure IV-3.B). Ce dernier en liant la calmoduline module de nombreuses cibles intracellulaires dont les canaux CNG eux même. Ce rétrocontrôle négatif, constitue avec les PDE le principal mécanisme de régulation négative des canaux CNG.

Parallèlement à cette première famille de canaux activés directement par les nucléotides cycliques, il existe dans les cellules excitables et notamment dans les neurones, une seconde famille de canaux activés par l'AMPc : les HCN. Chez les mammifères, il existe 4 sous familles de HCN. Leur ouverture nécessite une hyperpolarisation préalable de la membrane plasmique en plus de la fixation de l'AMPc et induit une dépolarisation lente par entrée de sodium.

A.2- Compartimentation du signal cAMP...

Il est de plus en plus admis que les différents protagonistes de la voie de signalisation AMPc ne sont pas répartis de façon diffuse au sein de la membrane plasmique ou dans le cytosol mais sont regroupés en signalosome grâce aux AKAP (**A**-**K**inase **A**nchoring **P**rotein) (Wong and Scott 2004). Un signalosome peut ainsi regrouper tous les partenaires de la signalisation: une PDE, une AKAP, une AC, la PKA ou les EPAC (Houslay 2010). Ce complexe fournit ainsi un contrôle spatial des effecteurs de l'AMPc en plus du contrôle temporel de la signalisation via une distribution cytosolique spécifique des PDE (Houslay, Baillie et al. 2007; Baillie 2009).

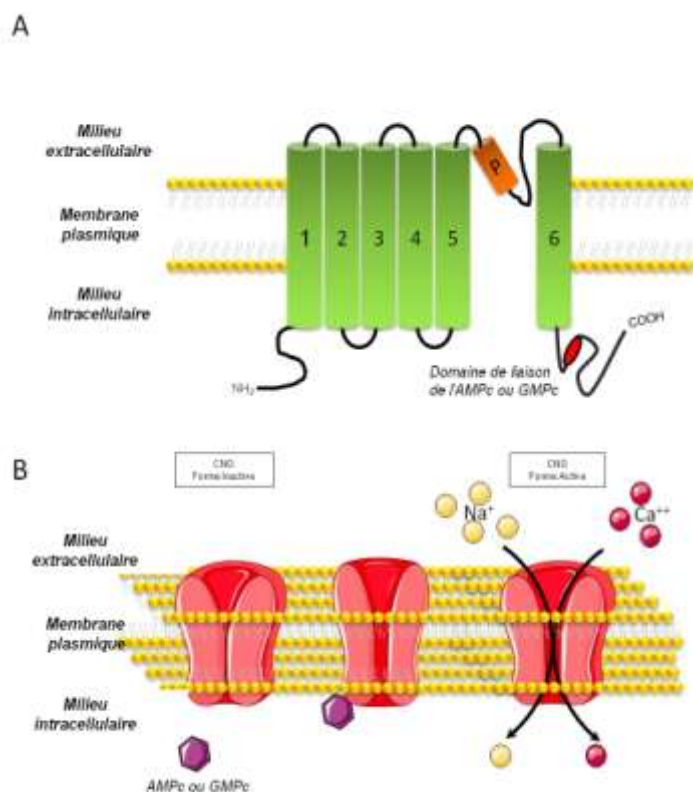


Figure IV-3 : Modèle structural et mode de fonctionnement des canaux régulés par les nucléotides cycliques.

A- Représentation schématique de la structure commune des canaux activés directement par les nucléotides cycliques.

B- Mode d'activation du canal CNG. L'ouverture du CNG est induite par la fixation d'une molécule de nucléotide cyclique (AMPc ou GMPc) au niveau intracellulaire. Dans cette configuration, le pore du canal s'ouvre et laisse entrer dans la cellule du calcium et du sodium. Cette entrée d'anions induit une dépolarisation de la membrane plasmique.

Cette compartimentation du signal semble être cruciale pour la survie de la cellule car cela lui permet de confiner sa dépense d'ATP.

A.2.1 – Importance des AKAP

La famille des AKAP compte aujourd'hui une cinquantaine de membre. Les membres de cette famille partagent d'avantage une fonction commune qu'une structure commune. Malgré cette diversité structurale, pour être considérée comme une AKAP, une protéine doit répondre à 3 critères. Toutes les AKAP présentent un domaine de liaison à la sous unité régulatrice de la PKA. Ensuite, une AKAP présente un domaine d'adressage spécifique qui lui impose un « cloisonnement » à un compartiment cellulaire donné. A titre d'exemple, l'AKAP 79/150 présente une séquence peptidique qui lui permet d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique, alors que l'AKAP-WAVE1 (**W**isKott-**A**ldrich **V**Erprolin-homology protein **1**) interagit avec le cytosquelette d'actine ou les membranes mitochondriales (Figure IV-4). Enfin, une AKAP doit être capable d'interagir avec plusieurs protéines de la signalisation AMPc (*protéines phosphatases, GSK, protéine Kinase,...*) et ainsi de co-localiser l'effecteur de la voie (*PKA ou EPAC*) avec ces différents partenaires au sein d'un « signalosome ». Les AKAP semblent donc agir comme des plateformes d'ancrage des différents protagonistes de la signalisation, à la fois ceux impliqués dans la transduction et ceux qui induisent l'arrêt, qu'elles maintiennent à proximité les uns des autres (Cooper 2005).

A.2.2 – Implication des PDE

Les PDE étant l'unique moyen de dégrader l'AMPc. Leur positionnement au sein de la cellule est crucial pour la régulation temporelle du signal AMPc. Il a ainsi été démontré que chaque PDE a un territoire d'expression spécifique, par exemple la PDE4B est sub-membranaire alors que la PDE4D est cytosolique (Terrin, Di Benedetto et al. 2006).

Ainsi le modèle de compartimentation actuel peut être résumé en 4 grandes idées :

- 1- Tout l'AMPc produit par les AC n'a pas accès à tous ses effecteurs mais seulement à quelques-uns en fonction du « signalosome » proximal
- 2- Tout l'AMPc n'a pas accès à toutes les PDE
- 3- Toutes les PKA réparties dans les différents compartiments cellulaires n'ont pas accès à tous les substrats
- 4- Il existe une relation spatiale stricte entre les RCPG, les AC et certains effecteurs en aval de l'AMPc

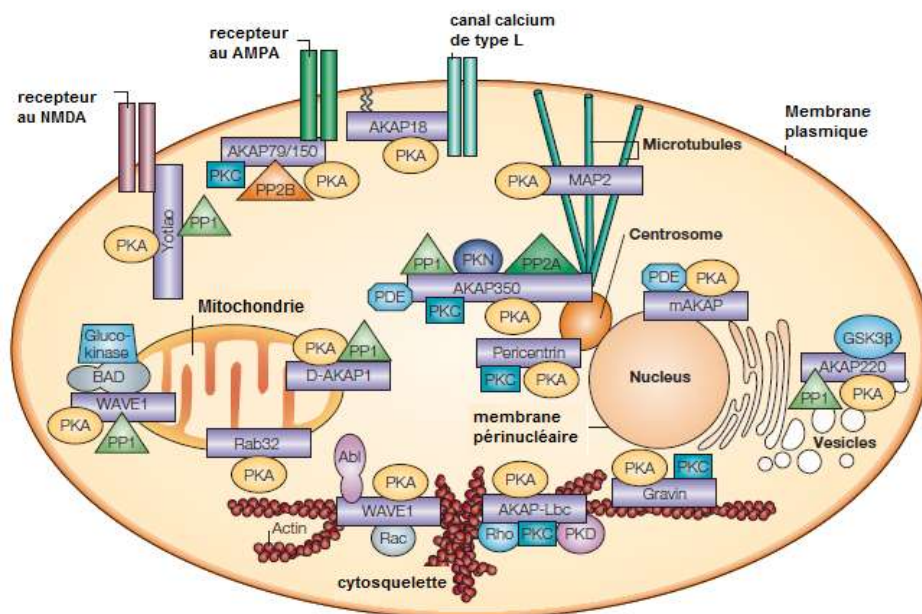


Figure IV-4 : Localisation subcellulaire de quelques complexes AKAP- effecteurs au sein d'une cellule. (d'après Wei Wong and John D. Scott, 2004)

Les AKAP (en violet) permettent de maintenir les effecteurs de l'AMPc (PKA et EPAC) à proximité de leurs effecteurs redans des régions subcellulaires spécifique (membrane plasmique, mitochondries, cytosquelette ou encore centrosome). Cet assemblage est à l'origine d'un véritable signalosome. L'application locale d'un agoniste de RCPG produit une variation localisée de la concentration d'AMPc. Cette modulation locale de l'AMPc n'activera que les effecteurs proximaux (PKA, EPAC ou CNG), qui à leur tour n'activerons que les cibles proches.

B] AMPc et fonctions immunitaires

De nombreux RCPG induisant la modulation de la concentration d'AMPc intracellulaire sont exprimés sur les cellules immunitaires (*neutrophiles, cellules dendritiques, lymphocytes T et B*) (Shirshev 2010). Globalement, il apparaît qu'une augmentation de la concentration cellulaire d'AMPc est immunosuppresseur, c'est-à-dire qu'elle affecte de façon négative les défenses immunitaires. Elle induit notamment une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (*TNF- α , IL-12, IFN- γ*) (Eigler, Siegmund et al. 1998), ainsi que de nombreuses chimiokines dont CCL2 et CXCL8 (van der Pouw Kraan, Boeije et al. 1995; Schnurr, Toy et al. 2005), une suppression de la prolifération des lymphocytes T (Kuklina and Shirshev 2000; Vang, Torgersen et al. 2001), une diminution du recrutement des éosinophiles par une diminution du chimiotactisme (Kaneko, Alvarez et al. 1995) ainsi qu'une diminution de la phagocytose par les macrophages (Aronoff, Canetti et al. 2004). Nous détaillons ici quelques-unes des actions immunomodulatrices de l'AMPc.

B.1 - AMPc, adhésion et migration des cellules du système immunitaire.

Le rôle de la voie AMPc dans ce processus d'adhésion a été rapporté pour la première fois au cours d'une étude sur le carcinome ovarien. Les auteurs montrent que l'activation de la voie de signalisation AMPc induit une augmentation de l'adhésion intégrine dépendante ($\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$) des cellules endothéliales (Rangarajan, Enserink et al. 2003). D'autres études confirment cette observation (Bos, de Bruyn et al. 2003; Enserink, Price et al. 2004) et montrent que cette augmentation d'adhésion concerne aussi les monocytes (Li, Liu et al. 1995; Figueiredo, Mui et al. 2006) et les lymphocytes T (Reedquist, Ross et al. 2000) selon un même mécanisme impliquant les intégrines. Ces observations sont remises en cause par les travaux de Fine et collaborateurs, qui montrent qu'une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire, par la forskoline et l'IBMX, induit au contraire une diminution de l'adhésion et de la migration chimiotactique dépendante des monocytes (Fine, Byrnes et al. 2001). Nous observons nous même suite à la stimulation des cellules par de la FSK, une diminution de ces deux fonctions (*chimiotactisme et adhésion*) déclenchées par l'axe CX3CL1/CX3CR1 (cf. partie Résultats Complémentaires).

Certains auteurs expliquent ces effets contradictoires de l'AMPc sur l'adhésion par une compartimentation différentielle du signal cAMP (Baillie and Houslay 2005) liée en particulier à la distribution des PDE qui limite la diffusion du signal (Lorenowicz, van Gils et al. 2006). D'autres montrent clairement que ces effets opposés de l'AMPc passent par des branches différentes de la signalisation AMPc, (PKA \rightarrow régulation négative ; EPAC \rightarrow régulation positive) (de Bruyn,

Rangarajan et al. 2002; Rangarajan, Enserink et al. 2003; Enserink, Price et al. 2004; Aronoff, Canetti et al. 2005)

B.2 - AMPc et fonctions immunes associées au monocyte/macrophage

Les monocytes et les macrophages représentent la première ligne de défense d'un organisme. Ce sont les premiers acteurs de l'immunité, responsable de l'initiation d'une réponse immunitaire non spécifique grâce à leur propriété de phagocytose des agents infectieux (*micro-organisme, parasites ou cellules*).

La phagocytose est un processus cellulaire pouvant être décrit en trois étapes : adhésion, ingestion et digestion de l'agent infectieux. La réalisation de ces différentes étapes nécessite notamment une modulation du cytosquelette et de la membrane plasmique ainsi qu'une opsonisation des anticorps présents à la surface des cellules phagocytaires en favorisant l'expression de différents récepteurs dont les ligands sont fortement exprimés à la surface de la cellule cible. Parmi les différentes molécules surexprimées à la surface des cellules phagocytaires, on trouve le récepteur Fcγ, les récepteurs du complément ainsi que des récepteurs du mannose. Plusieurs études montrent que l'augmentation de l'AMPc dans les macrophages diminue significativement leur capacité phagocytaire en diminuant le nombre de récepteurs du complément et de Fcγ, diminuant ainsi l'étape d'adhésion de ces cellules aux agents pathogènes (Nambu, Morita et al. 1989; Makranz, Cohen et al. 2006). Néanmoins les mécanismes de médiation de cet effet restent encore mal connus, notamment en ce qui concerne la branche de la voie impliquée : PKA vs EPAC. Afin de déterminer l'effecteur impliqué, les auteurs utilisent des analogues de l'AMPc spécifique de chacun de ces deux médiateurs tel que le 6-Bnz-cAMP qui active la voie PKA dépendante ou le 8-cPT-2'-O-Me-cAMP, un activateur spécifique de la protéine EPAC. L'utilisation de ces molécules dans la lignée macrophagique PL8 met en évidence un effet de l'AMPc sur la phagocytose passant par la voie de signalisation PKA/CREB (Hazan-Eitan, Weinstein et al. 2006). La même étude réalisée sur des macrophages alvéolaires humains implique la composante EPAC (Aronoff, Canetti et al. 2005; Canetti, Serezani et al. 2007). De même dans les monocytes, l'ensemble des effets de l'AMPc sur les différentes fonctions cellulaires sont modulées majoritairement par la PKA et non par EPAC (Bryn, Mahic et al. 2006).

En plus de son implication dans l'étape d'adhésion, l'AMPc contrôle également l'activation du métabolisme de l'oxygène des cellules phagocytaire (ou « explosion oxydative ») qui entraîne une production massive de dérivés de l'oxygène. Cela passe, en particulier par une inhibition de la NADPH oxydase par l'AMPc, ce qui conduit à une diminution de la production des espèces

réactives de l'oxygène (ROS) et donc contribue à diminuer la phagocytose (Bengis-Garber and Gruener 1996). Il a ainsi pu être démontré dans les deux modèles macrophagiques (hépatique (Usynin, Klotz et al. 2007) et alvéolaire (Aronoff, Carstens et al. 2006) que la stimulation de la voie AMPc/EPAC (par l'utilisation de l'analogue : 8-cPT-2'-O-Me-cAMP) induit une diminution de la production de ROS corrélant avec une diminution des défenses microbiennes.

B.3 – AMPc et fonctions lymphocytaires

B.3.1 – Lymphocytes T

Le rôle de l'AMPc comme inhibiteur des lymphocytes T a très bien été démontré (Kammer 1988; Vang, Torgersen et al. 2001; Hermann-Kleiter, Thuille et al. 2006). Plus précisément, l'augmentation d'AMPc intracellulaire dans ces cellules induit une inhibition de leur activation (Vang, Torgersen et al. 2001) et de leur prolifération (Skalhegg, Landmark et al. 1992). Les résultats ont montré que, dans les T matures, l'augmentation d'AMPc intracellulaire induit par une cascade impliquant la kinase Csk (**C**OOH-terminal **S**rc kinase) conduisent à une inactivation de la cascade de signalisation en aval du TCR (Tasken and Ruppelt 2006).

L'AMPc diminue aussi l'activité cytotoxique des T. grâce à une réduction significative de la production de nombreuses cytokines, tel que l'IL2, le TNF- α et l'IFN- γ par les lymphocytes Th1 (*Th* \rightarrow *Lymphocyte T helper* ; *Th1 et Th2 : sous populations 1 et 2 différenciées sur la base des cytokines sécrétées*) (Henney and Lichtenstein 1971).

Parallèlement à ces effets immunosuppresseurs, certaines études rapportent des effets plutôt inverse contribuant à une immunoactivation supporté par exemple par une augmentation de la sécrétion des cytokines par les Th2 sous l'action de l'AMPc (Betz and Fox 1991; Snijdwint, Kalinski et al. 1993; Haraguchi, Good et al. 1995; Hilkens, Snijders et al. 1996; Aandahl, Aukrust et al. 1998). Il a également été mis en évidence une augmentation transitoire de l'AMPc au sein des lymphocytes T, suite à leur adhésion aux DC. Cette augmentation de l'AMPc (Conche, Boulla et al. 2009) contribue à augmenter la sensibilité de la cellule T aux antigènes suite au contact Lymphocyte –DC décrit par la même équipe (Randriamampita, Boulla et al. 2003).

B.3.2 - Signal AMPc, Lymphocyte et VIH

Exemple de l'implication de l'AMPc dans la physiopathologie

Certaines études réalisées in vitro montrent qu'une infection de lignées lymphocytaires par le VIH conduit à une augmentation de la concentration d'AMPc cellulaire (Nokta and Pollard 1991; Hofmann, Nishanian et al. 1993; Aandahl, Aukrust et al. 1998). En outre, des études ex vivo

montrent que des cellules T de patients séropositifs contiennent deux fois plus d'AMPc que celles issues de personnes séronégatives (Hofmann, Nishanian et al. 1993; Aandahl, Aukrust et al. 1998).

Cette augmentation de l'AMPc intracellulaire semble passer par l'activation de la PKA sous influence de la glycoprotéine gp120 contenue dans l'enveloppe virale (Hofmann, Nishanian et al. 1993; Masci, Galgani et al. 2003; Becker, Taube et al. 2009). Le mécanisme par lequel cette protéine augmente la concentration d'AMPc est encore inconnu. Une étude tend à associer cet effet à des récepteurs chimiokineramiques et plus particulièrement au CXCR4 (Masci, Galgani et al. 2003).

Plusieurs études ont montré que l'activation de la voie AMPc dans les cellules T infectées contribue à inhiber la réponse immunitaire et ainsi à favoriser l'infection. L'adhésion du virus par le biais de la gp120 sur le CXCR4 diminue significativement la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. Cet effet est en rapport avec une activation de la PKA et de CREB (Hofmann, Nishanian et al. 1993; Masci, Galgani et al. 2003). A l'inverse, la diminution de l'AMPc restaure la prolifération et la cytotoxicité de ces cellules (Hofmann, Nishanian et al. 1993; Hofmann, Nishanian et al. 1993). L'AMPc agit également sur les T régulateurs : lors de l'infection VIH, on assiste à une suppression de la potentiation de ces cellules par une augmentation du niveau de CTLA-4 (**C**ytotoxic **T**-**L**ymphocyte **A**ntigen 4) (Becker, Taube et al. 2009). Cette protéine est connue pour être un régulateur négatif de l'immunité.

L'ensemble de ces études décrivent la signalisation AMPc comme étant un élément clé du processus d'infection des lymphocytes T par le VIH particulièrement en supprimant la réponse immunitaire. Néanmoins, il semble que son rôle soit encore plus complexe. Plusieurs études rapportent un effet inhibiteur de l'AMPc sur la capacité du virus à se répliquer. Une augmentation de l'AMPc, soit par le biais d'une activation de l'AC par de la FSK, soit après un blocage de la dégradation par un traitement avec du rolipram, un inhibiteur spécifique de la PDE4, est corrélée avec une diminution de la transcription virale ainsi qu'une diminution du niveau de la protéine HIV-p24^{Gag} dans les lymphocytes T (Navarro, Punzon et al. 1998; Sun, Li et al. 2000). Dans la même logique, une étude montre que dans les cellules T naïves, l'AMPc diminue significativement l'import nucléaire, la translocation et la réplication de l'ADN viral, par comparaison avec des cellules T mémoires. On rapporte également un effet sur l'expression des corécepteurs du VIH, CCR5 et CXCR4 (Thivierge, Le Gouill et al. 1998; By, Durand-Gorde et al. 2010).

L'ensemble de ces données suggèrent que la voie de l'AMPc/PKA affecte l'infection par le VIH à la fois sur les étapes de pré- et de post-intégration. Ainsi le rôle de l'AMPc au cours de l'infection par le VIH et plus globalement dans la réponse immunitaire semble dépasser la simple

fonction d'immunosuppresseur. Ces connaissances peuvent permettre d'établir de nouvelles cibles thérapeutiques dans la thérapie antirétrovirale ou identifier des molécules cibles avec un potentiel immunorégulateur, ce qui pourrait aider à restaurer la dysfonction immunitaire dans le cadre de cette pathologie.

B.3.3 – Lymphocytes B

L'AMPc et ses effecteurs, PKA et EPAC, jouent un rôle important dans la régulation de l'activité des lymphocytes B. Les données actuelles ne permettent pas de formuler distinctement la contribution respective de ces effecteurs mais montrent une action préférentielle de la PKA sur les fonctions cellulaires des lymphocytes B matures et par le biais de la protéine EPAC dans les formes cellulaires immatures. L'utilisation de l'analogue de l'AMPc, PKA sensible (6-Bnz-cAMP), sur des lymphocytes B matures de la rate de souris, inhibe la voie ERK1/2, cela indépendamment de l'activation des récepteurs de lymphocyte B (BCR), ce qui se répercute sur les fonctions de ces cellules et conduit à une diminution de la réponse immunitaire humorale (Yue, Dodge et al. 1998; Kaibuchi, Kuroda et al. 1999).

A la différence des lymphocytes B matures, l'effet de l'AMPc dans les formes immatures est plutôt EPAC dépendant. Dans ces cellules, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire se traduit par une inhibition de la voie PKB et cela indépendamment de l'activation de la PKA. En outre, il a été démontré que l'AMPc, par le biais de la protéine EPAC, module le processus de sélection négative des lymphocytes B immatures, avec un effet majoritairement pro-apoptotique. Nous savons que la réponse des cellules B immatures à l'activation des BCR par un antigène dépend de la balance entre signaux pro-apoptotiques, passant principalement par ERK1/2 (Marchildon, Casnelli et al. 1984; Okada, Nada et al. 1991) et anti-apoptotiques passant par la voie PI3K/PKB (Brdicka, Pavlistova et al. 2000; Kawabuchi, Satomi et al. 2000).

C] Outils technologiques permettant l'étude du signal AMPc

De nombreuses techniques existent pour analyser le niveau d'AMPc cellulaire, depuis les dosages classiques par anticorps jusqu'aux technologies récentes de suivi en temps réel. Nous détaillerons ici quelques-uns de ces outils en décrivant leur principe (**Tableau 4.2**).

Technique	Principe	Suivi en temps réel ou Accumulation	Sur cellule Unique ou Population	Références
Dosage RIA ou HitHUNTER (DiscoverX®)	Quantification post lyse cellulaire	Accumulation	Population	
Sonde FICRhRR	Sonde FRET PKA-like	Dynamique	Cellule Unique (imagerie)	Adams et al. 1991 Goaillard et al. 2001 Zaccolo & Pozzan 2002
Canaux CNG et HCN	Electrophysiologie	Dynamique	Cellule Unique (imagerie)	Rich et al. 2000 Rochais et al. 2004 Nikolaev et al. 2006
Sonde EPAC	Sonde FRET	Dynamique	Cellule Unique (imagerie) ou Population (lecteur de plaque)	Ponsioen et al. 2004 Klarenbeek et al. 2011 Gorshkov and Zhang 2014
Sonde AKAR	Sonde FRET PKA-like	Dynamique	Cellule Unique (imagerie) ou Population (lecteur de plaque)	Zhang et al. 2001 Zhou et al. 2012 Agarwal et al. 2014
Sonde GloSENSOR	Sonde Bioluminescente	Dynamique	Population (lecteur de plaque)	Binkowski et al. 2011

Tableau IV.2 : Classification des outils permettant l'étude de l'AMPc intracellulaire

C.1 – Technique de Dosage de l'AMPc intracellulaire

La plus ancienne technique de dosage de l'AMPc est basée sur l'utilisation d'anticorps radio-marqués (RIA). La RIA est un procédé sensible qui permet la détection de l'ensemble de l'AMPc intracellulaire à partir d'un lysat cellulaire. Il existe aujourd'hui des variantes non radioactives de cette technique (HitHunter ® by Discoverx).

Ces techniques ont globalement deux inconvénients : elles nécessitent une lyse cellulaire et ne permettent pas de suivre les modulations d'AMPc dans les cellules avec une résolution spatiale. Or comme nous l'avons exposé plus haut, il existe une compartimentation du signal AMPc. Par conséquent, d'autres méthodes sont nécessaires pour étudier les cinétiques et la distribution spatiale du signal AMPc.

C.2 – Techniques résolutive utilisant le FRET ou la luminescence

Les premières techniques résolutive utilisaient la PKA et le processus de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) (Adams, Harootunian et al. 1991; Zaccolo, De Giorgi et al. 2000; Castro, Guiot et al. 2014; Gorshkov and Zhang 2014). Pour rappel, le FRET est un phénomène quantique consistant en une transmission d'énergie non radiative (non lumineuse en l'occurrence) d'une molécule fluorescente qualifiée de donneur à une molécule « acceptrice », elle aussi fluorescente, qui va donc émettre. Cette transmission d'énergie n'est possible qu'à certaines conditions : (i) la distance entre les deux molécules doit être inférieure à 100Å ; (ii) même proches, l'orientation de ces des molécules doit être adéquate à un travers d'énergie entre les deux molécules fluorescentes, (iii) le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'excitation de l'accepteur (Figure IV-5). Sur ce principe des biocapteurs de plus en plus sensibles et résolutifs de l'AMPc ont été développés (Nikolaev and Lohse 2006). En plus de pouvoir étudier la cinétique du signal AMPc, ces outils en permettent une visualisation par imagerie en temps réel.

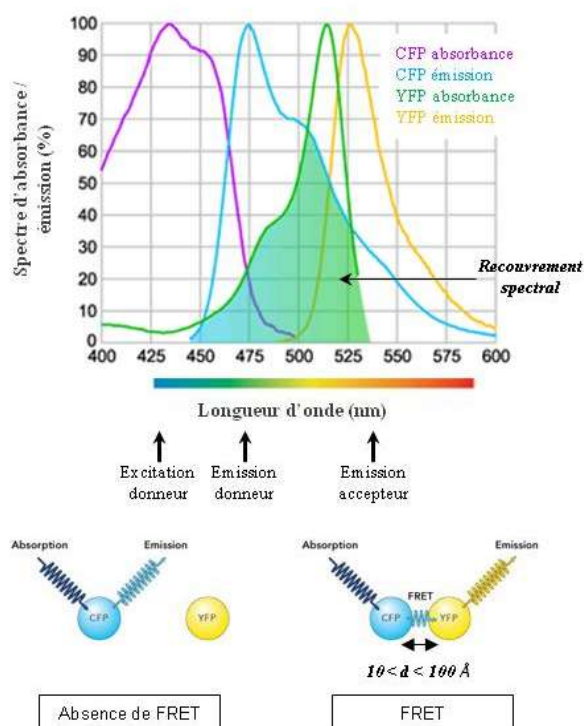


Figure IV-5 : Principe du FRET.

Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption du receveur et lorsque ces fluorophores présentent une orientation et une distance (<100 Å) favorables.

CFP: Cyan Fluorescent Protein, YFP: Yellow Fluorescent Protein.

C.2.1 - Techniques basées sur la PKA ou ses cibles

La première technique de visualisation de l'AMPc par imagerie de fluorescence a été développée par l'équipe de Roger Tsien aux Etats-Unis. Cette sonde, baptisée FICRhR est une PKA génétiquement modifiée : ses sous-unités catalytiques sont marquées par la fluorescéine et

ses sous-unités régulatrices par la rhodamine (Adams, Harootunian et al. 1991). En absence d'AMPc, l'excitation de la fluoescéine est transmise par FRET à la rhodamine car les deux fluorophores sont suffisamment proches. Lors d'une élévation d'AMPc, la dissociation des sous-unités catalytiques et régulatrices conduit à un effondrement du signal FRET.

FICRhR a été utilisé avec succès dans plusieurs applications différentes. Il a notamment permis d'étudier la cinétique de réponse AMPc dans les neurones (Bacskai, Hochner et al. 1993; Hempel, Noll et al. 1996; Goillard and Vincent 2002). Les premières preuves de la compartimentation du signal AMPc ont d'ailleurs été observées grâce à cette sonde. Cependant l'utilisation de cette sonde était très limitée car elle nécessitait la micro-injection de protéines recombinantes marquées. Une amélioration de cette sonde a consisté au remplacement des fluorophores chimiques par des variants de la GFP, permettant de la coder génétiquement et de la faire exprimer par les cellules (Zaccolo, De Giorgi et al. 2000). Malgré cela, cette sonde présente quelques défauts majeurs, liés à la complexité de son mécanisme d'activation, à son adressage par le biais des AKAPs et surtout parce que l'activité kinase est préservée dans la sonde. De plus il semble que le signal FRET donné par les capteurs PKA traduit la dissociation du complexe PKA plutôt que les changements de concentrations d'AMPc (Goillard, Vincent et al. 2001).

Les sondes AKAR (**A**-Kinase **A**ctivity **R**eporter) permettent également une mesure de l'activité PKA en temps réel en recourant au principe du FRET. Il s'agit d'une protéine recombinante constituée d'une chaîne polypeptidique portant un site consensus de phosphorylation de la PKA et d'un domaine de reconnaissance des aa phosphorylés, insérés entre des variants de la CFP (donneur) et la YFP (accepteur). Lorsque la PKA est activée, elle phosphoryle AKAR sur son site consensus, entraînant son repliement et sa fixation au domaine de reconnaissance, ce qui rapproche les deux fluorophores. Ce changement de conformation permet le transfert d'énergie de la fluorescence de la CFP vers la YFP (Figure IV-6.A) La première version d'AKAR a été mise au point en 2001 par Jin Zhang dans le laboratoire de Roger Tsien (Zhang, Ma et al. 2001) Plusieurs versions de la sonde AKAR ont été développées, modifiées et améliorées afin d'analyser la dynamique spatiotemporelle de l'activité PKA dans des cellules vivantes (Allen and Zhang 2006; Zhou, Herbst-Robinson et al. 2012).

Une sonde luminescente, appelée GloSensor™ a été développée et commercialisée par Promega®. Cette sonde est composée d'une forme mutante de la luciférase issue de *Photinus Pyralis* dans laquelle la sous unité catalytique de la PKA, comportant le site de liaison de l'AMPc, a été inséré (Figure IV-6.B). Lors de la liaison de l'AMPc, un changement conformationnel est

induit ce qui se traduit par un rapprochement des deux parties de la luciférase (principe de la complémentation enzymatique) et à une émission de lumière proportionnelle à la quantité de sonde « activée ». Il s'agit d'une technique proposée initialement pour le criblage haut débit d'agoniste ou d'antagoniste des RCPG. Nous avons choisi cette technique pour étudier la signalisation AMPc en aval des RCK car elle fournit un moyen simple et rapide pour l'investigation d'une réponse AMPc. Elle présente l'avantage de pouvoir être travaillée en lecteur de plaque, ainsi plusieurs concentrations ou chimiokines différentes peuvent être comparées simultanément. Toutefois, elle ne permet que la visualisation d'une réponse globale et non d'une réponse issu d'un compartiment subcellulaire donné. Il s'agit d'un excellent outil pour commencer à investiguer les réponses AMPc en aval d'un RCPG. Cette première étude peut être complétée par une étude en imagerie réalisée avec une sonde EPAC adressée spécifiquement dans un domaine cellulaire donné.

C.2.2 – Techniques résolutives basées sur les cibles de l'AMPc

Une autre technique de mesure de l'AMPc en temps réel sur des cellules vivantes a été développée sur la base des CNG. Ce sont des canaux cationiques non sélectifs constitués de quatre sous-unités avec un site intracellulaire pour l'AMPc / GMPc (cf.§A.1.2). L'augmentation de l'AMPc conduit à un déclenchement rapide de ces canaux. Cette activation qui peut être enregistrée par des méthodes électro physiologiques ou d'imagerie calcique. Néanmoins, les CNG natifs ont une affinité à l'AMPc beaucoup plus faible que la PKA. Par conséquent, plusieurs mutants ont été créés pour augmenter l'affinité et la sélectivité de ces canaux pour l'AMPc (Rich, Fagan et al. 2000). Du fait de leur nature de canal, les CNG sont localisés à la membrane, ce qui est à l'origine de leur principal inconvénient : ils ne peuvent mesurer que les fluctuations d'AMPc à la membrane plasmique.

C.2.3 – Sondes basées sur EPAC

Rappelons que la molécule EPAC se compose d'un domaine régulateur comportant un site de liaison à l'AMPc et un domaine catalytique, qui a pour fonction de charger un GTP sur la petite protéine G, Rap1, et ainsi de la maintenir dans un état actif (**Figure IV-5.C**). Deux groupes indépendants ont créés des sondes FRET sur le modèle EPAC. Pour cela ils ont encadré la molécule EPAC de deux fluorophores : CFP et YFP (DiPilato, Cheng et al. 2004; Ponsioen, Zhao et al. 2004). Les auteurs suppriment le domaine DEP de la protéine endogène ce qui aura pour effet une distribution cytosolique de la sonde et surtout une abolition de l'activité EPAC par diminution de l'interaction avec sa cible : la protéine Rap1. Une seconde mutation (T781A, F782A) vient compléter cette abolition de l'activité EPAC-like.

La liaison de l'AMPc de capteurs induit un changement de conformation qui conduit à une diminution de FRET entre les fluorophores. Les affinités de ces capteurs pour l'AMPc sont cependant nettement inférieures à celle de la PKA. Ceci permet de visualiser des concentrations d'AMPc élevés mais peut conduire à une incapacité à détecter des concentrations plus faibles d'AMPc, qui sont rapportées par les sondes PKA. D'un autre côté, cette plus faible affinité est associée à une dissociation plus rapide de l'AMPc ; ainsi les sondes EPAC mettent en évidence des cinétiques plus rapides que celle mesurées par les sondes PKA (Ponsioen, Zhao et al. 2004).

Le développement de biosenseurs FRET pour l'AMPc basés sur EPAC est en perpétuelle évolution. Ainsi, Klarenbeek et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence un nouveau senseur qui semble encore plus performant, « T Epac-vv » (Klarenbeek, Goedhart et al. 2011). C'est cette dernière version d'EPAC que nous avons utilisé pour l'étude du signal AMPc en aval des RCK en imagerie.

Les nouvelles générations possèdent un signal d'adressage spécifique aux différents compartiments subcellulaires, elles permettent ainsi d'enregistrer des signaux AMPc en tenant compte de la compartimentation du signal AMPc (Agarwal and Agarwal 2014) .

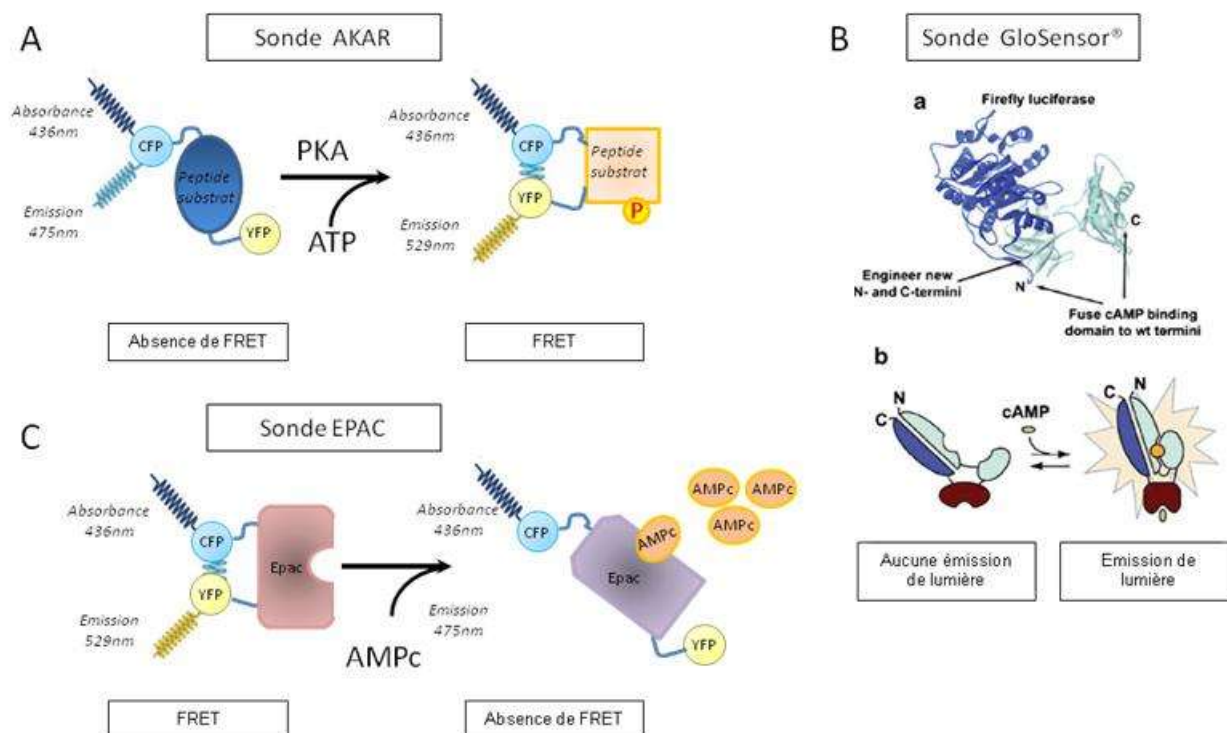


Figure IV-6 : Outils dynamiques de mesure de l'AMPc cellulaire.

- A- Sonde FRET AKAR : la sonde est dans une configuration où un transfert d'énergie entre le fluorophore donneur et accepteur suite à une phosphorylation de son peptide substrat (région centrale en bleu) par la PKA.
- B- Sonde Bioluminescente GloSensor®- Représentation en 3D de la sonde (a) et Principe de fonctionnement de la sonde (b): la fixation d'une molécule d'AMPc sur le domaine PKA de la sonde (marron) induit un changement conformationnel et à l'activation de la luciférase. Cette dernière en hydrolysant son substrat émet de la lumière.
- C- Sonde FRET EPAC : la sonde est dans une configuration où le FRET est possible en absence d'AMPc cellulaire. La fixation d'une molécule d'AMPc induit une diminution du transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur.

CFP: Cyan Fluorescent Protein, YFP: Yellow Fluorescent Protein.

V. Objectif de la thèse

L'objectif général de l'équipe est de mieux connaître les fonctions des chimiokines et de leurs récepteurs, en particulier en situation inflammatoire et/ou pathologique. L'équipe s'est concentrée en particulier sur l'étude moléculaire et structurale du couple CX3CL1/CX3CR1 afin de définir des moyens d'intervention pharmacologiques dans différentes pathologies. Mon projet de thèse consistait donc à étudier certains signaux déclenchés en aval du CX3CR1, et leurs éventuelles différences selon leur activation par la forme soluble ou membranaire du CX3CL1. Comme exposé dans l'introduction bibliographique, ces signaux sont pléiotropes et mettent en œuvre plusieurs voies parallèles. Nous choisissons d'autres signaux que la phosphorylation des MAPK ou que la voie calcique traditionnellement étudiées et qui n'ont révélé aucune variation notable entre les variants du CX3CR1 (Daoudi, Lavergne et al. 2004). Comme il est admis que les RCK sont couplés à une protéine G de la famille $G_{i/o}$, et sont donc capables, après activation par leurs ligands, d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, conduisant à une diminution de la concentration d'AMPc intracellulaire, nous nous sommes principalement intéressés à cette voie de signalisation, jusqu'ici admise mais méconnue en aval des RCK.

Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux grands axes. Le premier consiste à la caractérisation de la réponse AMPc en aval des RCK et plus particulièrement en aval du récepteur CX3CR1. Dans cette première partie nous étudions la différence de signalisation AMPc en aval du CX3CR1 stimulé par les deux formes du CX3CL1 et explicitons les mécanismes impliqués. Le rôle de cette signalisation AMPc en aval du CX3CR1 sur les fonctions associées à ce couple récepteur ligands a fait l'objet de la seconde partie de ma thèse, Nous avons ainsi étudié l'effet de l'AMPc sur les fonctions adhésives et chimiotactiques du couple CX3CL1/CX3CR1.



ARTICLE I

De nombreux processus physiologiques et physiopathologiques font intervenir le système des chimiokines. De ce fait, la connaissance et la compréhension des réponses cellulaires en aval de leurs récepteurs (RCK) sont donc cruciales, notamment dans le cadre du développement de molécules « médicaments » basées sur les chimiokines, leurs analogues ou des antagonistes des RCK. Parmi les signaux déclenchés en aval des RCK, l'existence d'une voie de signalisation AMPc en aval des RCK est connue depuis leur découverte mais sa cinétique n'a jamais été explicitée. Parallèlement, l'AMPc est décrit comme une molécule immunomodulatrice dont le rôle en aval des RCK reste controversé. La commercialisation d'une nouvelle génération de biocapteurs permettant le suivi en temps réel de la concentration cellulaire d'AMPc est à l'origine de ce travail de thèse. L'existence de deux formes physiologiques du ligand CX3CL1, une forme soluble et une forme membranaire, justifie son utilisation comme principal modèle d'étude.

Les résultats obtenus être séparés en deux parties :

1- Optimisation d'une technique de mesure en lecteur de plaque de l'AMPc en réponse aux chimiokines solubles – Exemple des chimiokines CX3CL1 et CXCL12.

L'utilisation de la sonde GloSensor dans le but d'étudier les cinétiques des réponses chimiokinergiques a nécessité une phase d'optimisation. Nous avons établi un clone HEK293 exprimant de manière stable le récepteur d'intérêt, CX3CR1 et la sonde (HEKgloCX3CR1). L'utilisation majoritaire de ce modèle cellulaire s'explique par les difficultés techniques rencontrées pour faire exprimer la sonde dans un modèle cellulaire plus physiologique. En effet, nous avons testé différents protocoles de transfection, électroporation et nucléoporation sur différents modèles cellulaires : lignées murines ou humaines (THP-1, U937, Monomac 6, BV-2, HBP-ALL, Jurkat, NK) ou des cellules natives (PBMC totaux, monocytes CD14⁺). Un lentivirus a également été généré en collaboration avec une équipe du centre de recherche mais sa transduction dans les différents types cellulaires, lignée ou cellules primaires est restée sans succès, sauf dans les HEK293. Aussi malgré ses limites, le clone HEKgloCX3CR1, nous a permis

d'expliciter la cinétique de la réponse AMPc induite par les chimiokines. L'étude de la réponse à la chimiokine CXCL12 a pu être réalisée grâce à l'expression endogène du récepteur CXCR4 à la surface des ces cellules.

Contrairement aux études du même type réalisées avec d'autres techniques de mesure de l'AMPc par accumulation, nous n'utilisons pas la FSK combiné à l'IBMX, un inhibiteur des PDE, mais la FSK seule et à faible dose ($< 1\mu\text{M}$). De ce fait, malgré un modèle cellulaire basique, les HEK293, nous travaillons dans un contexte cellulaire proche de la physiologie, car nous ne supprimons pas l'activité de dégradation induite par les PDE.

Nous avons donc, mis en évidence une réponse AMPc inhibitrice induite par les chimiokines solubles, CX3CL1 et CXCL12 (Article - Figure 1). Ces réponses présentent une cinétique et une amplitude indépendantes des différentes conditions de mesure. En effet la nature de la molécule utilisée pour préstimuler le niveau d'AMPc intracellulaire, forskoline (FSK) ou prostaglandine (PGE2) n'influence ni l'amplitude, ni l'allure de la réponse aux chimiokines. De même, les réponses chimiokinergiques sont inchangées indépendamment de plusieurs paramètres dont:

- la concentration de FSK utilisée (à condition d'être dans la phase linéaire de la sonde) (Article – Figure 3 & Figure S3)
- le moment d'addition de la chimiokine par rapport à l'addition de la FSK (Article – Figure 2)
- la sous famille de chimiokine considérée (Article – Figure 5)

L'activation d'un RCK ne semble pas induire de désensibilisation croisée des autres RCK exprimés à la surface de la même cellule (Article – Figure 6)

Nous avons ainsi standardisé la mesure des réponses chimiokinergiques associées à une diminution d'AMPc et ainsi utilisé cette méthode pour identifier ou confirmer le caractère antagoniste des différentes molécules développées au sein du laboratoire. C'est le cas de la molécule F1 (Article – Figure 8A & Figure S9) un antagoniste compétitif de CX3CL1, utilisé pour étudier indirectement la cinétique d'internalisation du récepteur CX3CR1. En effet, l'addition de F1 à différents temps

après le CX3CL1, induit l'arrêt de la réponse AMPc et son retour rapide à zéro. Toutefois ce phénomène n'est observable qu'au cours des 16 premières minutes après l'addition de la chimiokine (Article – Figure 8A). L'étude par cytométrie en flux de l'expression du CX3CR1 à la surface révèle que le nombre de récepteur est réduit de moitié 30 minutes après addition de la chimiokine soluble (Article – Figure 8B).

L'inhibition de l'internalisation par le dynasore abolit la diminution du nombre de récepteurs consécutive à l'addition de la chimiokine et modifie la cinétique de retour de la réponse AMPc inhibitrice (Article – Figure 8C).

Il semble donc que l'internalisation du récepteur soit l'un des paramètres à l'origine du retour à zéro de la réponse.

L'effet des phosphodiésterases (PDE) a été étudié à l'aide de l'IBMX, un inhibiteur de ces dernières. Nous observons une modification de la cinétique des réponses chimiokinergiques, aussi bien sur leur cinétique d'apparition (maximum obtenu en 8 minutes sous FSK contre 20 minutes sous IBMX) avec un ralentissement du temps d'obtention de la réponse maximale que sur la cinétique de retour (Article – Figure 4 & Figure S4). Par contre, son amplitude n'est que peu affectée.

2- Mise en évidence d'une réponse AMPc différentielle en aval du CX3CR1 activé par les formes soluble ou membranaire de son ligand, la chimiokine CX3CL1.

Une adaptation du protocole de mesure a été nécessaire afin d'étudier la réponse à la chimiokine membranaire. En effet, lors de la mesure de la réponse induite par les chimiokines solubles, les cellules HEKglcX3CR1 sont adhérentes au fond du puits de la plaque de mesure et les solutions de FSK et chimiokines sont additionnées par-dessus. Dans le cas de la mesure de la réponse à la forme membranaire, les cellules HEKglcX3CR1 sont mises en suspension et déposées sur un tapis de cellules L929 exprimant ou non CX3CL1 à leur surface. Ce sont ces dernières qui sont adhérentes au fond de la plaque. Nous avons donc vérifié que la mise en suspension des HEKglcX3CR1 n'affecte pas la réponse AMPc (Article – Figure S6).

Une réponse AMPc inhibitrice a été mesurée en aval du CX3CR1 activé par la forme membranaire du ligand (Article – Figure 7). Il s'agit du premier signal mesuré

induit par cette forme du CX3CL1. En effet, le CX3CL1 membranaire se « cantonné » à un rôle mécanique de molécule d'adhérence.

Comparée à la réponse observée en aval du récepteur activé par la forme soluble (Article – Figure 7B), cette réponse à la forme membranaire est nettement plus lente aussi bien dans sa phase de descente que dans sa remontée. De plus elle apparaît comme quantitativement différente. Contrairement à la forme soluble, elle ne mobilise pas l'ensemble des récepteurs de la cellule, malgré une amplitude de réponse similaire à la réponse observée avec une dose de CX3CL1 soluble saturante. En effet, des HEKgloCX3CR1 mises en contact sur des LCX3CL1 et secondairement stimulées par une addition de CX3CL1 soluble, présentent une réponse avec deux vagues: une première réponse à la forme membranaire suivie de la réponse à la forme soluble (Article – Figure 7A). Par comparaison deux additions séquentielles de CX3CL1 soluble n'engendrent qu'une seule vague de réponse (Article – Figure 6).

Une internalisation différentielle du récepteur semble être en partie à l'origine de cette différence de cinétique des réponses AMPc induites par les formes solubles ou membranaires (Article – Figure 8B vs Figure 9). L'hypothèse d'une libération progressive de CX3CL1 soluble dans le milieu cellulaire à partir de la forme membranaire a été écartée grâce à l'expérience qui a consisté à additionner sur des HEKgloSensor les surnageants issus de culture de L929 ou LCX3CL1 (Article – Figure S8).

Ce travail a permis d'optimiser la mesure d'une réponse AMPc inhibitrice en lecteur de plaque, facilitant ainsi l'étude des cinétiques des réponses chimiokinerigues et par extension le criblage des peptides ou protéines antagonistes développées pour agir sur la signalisation en aval des RCK. Cette technique nous a permis d'explicitier pour la première fois une signalisation en aval du récepteur activé par la forme membranaire du CX3CL1 en plus de celle induite par la forme soluble. Les mécanismes à l'origine de la différence de cinétique observée sous CX3CL1 soluble ou membranaires restent à découvrir, mais il semble que l'internalisation et les phosphodiesterases ne soient pas indifférentes à cette thématique.

Monitoring the cAMP-inhibitory responses to chemokines

Evidence of kinetically different responses to the two forms of CX3CL1

Virginia Felouzis^{*‡}, Patricia Hermand^{*‡}, Christophe Combadière^{*‡} and Philippe Deterre^{*‡}

^{*}INSERM, U 1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 boulevard de l'Hôpital F-75013, Paris, France

[†]Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMRS CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 boulevard de l'Hôpital F-75013, Paris, France

[‡]CNRS, ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, F-75013, 91 boulevard de l'Hôpital Paris, France

Corresponding author: Philippe Deterre, philippe.deterre@upmc.fr

Background: Kinetics of the Gi-mediated cAMP-inhibitory chemokine responses is unknown

Results: Using cAMP-related biosensor, the responses to both soluble and membrane forms of CX3CL1 are monitored in real time. Membrane form evokes a prolonged response **Conclusion:** the cAMP-inhibitory response is mainly driven by the internalization of the cognate receptor

Significance: Biosensor could help to precise the role of cAMP-inhibitory responses

Keywords: chemokine, cAMP, biosensor, adenylyl-cyclase, Gi, phosphodiesterase, internalization, CXCR4, CXCL12, CX3CR1, CX3CL1, forskolin

Abstract

Receptors of the chemokines are all G-protein Coupled Receptors (GPCR) coupled to members of the Gi family, whose primary function is to inhibit the cellular adenylyl cyclases. We use here a cAMP-related luminescent biosensor (GlosensorTM F-22) to monitor in real time the response downstream the chemokine receptors, and especially CX3CR1 and CXCR4 after activation by CX3CL1 and CXCL12. We found that the amplitude and kinetic profile of chemokine responses were conserved in different cell types and was independent of the nature and of the concentration of molecules used for the previous cAMP stimulation, as the adenylate cyclase activator forskolin or ligand of Gs-coupled GPCR. This response outline was also independent of the time elapsed between the additions of the cAMP-stimulatory ligand and of the chemokine. Moreover the response amplitude was only slightly changed in the presence of inhibitors of cAMP-related phosphodiesterases. We show that this conserved chemokinergic response could be accounted by a simple model combining Gi action on adenylate cyclase and an associated phosphodiesterase activity whom activity is a linear function of the cellular cAMP concentration. Finally, using competitive inhibitors of CX3CR1 and inhibitors of internalization, we found that the outline of the CX3CL1 response is mainly governed by the surface receptors and that receptor internalization had a major role in the decline of the response. Consistently, we found that the native membrane form of CX3CL1, which did not induce the receptor internalization, evoked a significantly prolonged cAMP-inhibitory response as compared to the one induced by the soluble form. We conclude that cAMP-related biosensors are valuable tools to analyze in details the chemokines cellular response and could help to decipher their precise role in modulating the cellular action of cAMP. We conclude that cAMP-related biosensors are valuable tools to analyze in details the chemokines cellular response and could help to decipher their precise role in modulating the cellular action of cAMP.

Introduction

Cyclic AMP (cAMP) is a ubiquitous second messenger known to regulate diverse functions (Sutherland, 1972). The cAMP signal is mediated by G-protein coupled receptors and transmits information to downstream effectors like PKA and EPAC. Recent use of FRET and BRET biosensors (Rich and Karpen, 2002; Willoughby and Cooper, 2008; Vilardaga et al., 2009; Lohse et al., 2012; Castro et al., 2014) allowed to unravel subtle kinetic information of this cellular signal and unexpected compartmentation and diffusional restrictions of the cAMP signal and partners (Rich et al., 2001; DiPilato et al., 2004; Mongillo et al., 2004). Most of these studies were done with cAMP-stimulatory ligands like adrenergic ones in cardiomyocytes (Mongillo et al., 2004) or dopaminergic neuronal responses (Castro et al., 2013) and rarely addressed the Gi-mediated inhibitory signals, like those evoked by chemotactic cytokines or chemokines.

Chemokines are secreted soluble molecules expressed by numerous immune cell types, either constitutively or upon induction by inflammatory conditions. They play a central role in cell chemotaxis and positioning in the immune system and development. Their signaling is central to the inflammatory process and is dysregulated in autoimmune disorders, rheumatologic diseases and atherosclerosis (Baggiolini, 1998; Viola and Luster, 2008). Chemokine receptors are essentially G-protein Coupled Receptors (GPCR), members of the Rhodopsin class, coupled to Gi classes of G-proteins. However, some chemokine receptors were recently found coupled to Gq (Shi et al., 2007). The chemotactic activity of chemokines involves both activation of cell movement as well as adherence on various support via integrins. While evidenced as early as calcium responses downward chemokine receptors (Myers et al., 1995), the role of cAMP in such functional roles of chemokine remains controversial. Some studies indicate a regulatory role of the messenger in monocyte chemotaxis towards CCL2 (O'Boyle et al., 2007), while others indicate a positive role (Lorenowicz et al., 2006) or no role at all (Jarnagin et al., 1999). Considering the monocytic adhesion, the same dispute exists (Cambien et al., 2001; Lorenowicz et al., 2006; Mori et al., 2007), probably due to lacking detailed analysis of the cAMP variation. So the study of the cAMP signal evoked by chemokines in real time is urgently awaited.

While chemokines generally operate through cell adhesion by inducing or activating classical adhesive molecules like integrins (Moser and Loetscher, 2001; Rot and Von Andrian, 2004), CX3CL1 is an exception since it is natively expressed as a transmembrane protein that is endowed with an adhesive function unique among chemokines. When interacting with its unique receptor, CX3CR1, CX3CL1 induce cell-cell adhesion (Ludwig and Weber, 2007). It can be cleaved by metalloproteinases, such as ADAM10 and ADAM17 (Garton et al., 2001; Hundhausen et al., 2003; Ludwig et al., 2005), to yield a soluble form that is chemotactic. Until now, the cAMP-inhibitory signal has not been involved in any CX3CL1/CX3CR1 functional responses. Moreover, it seems that the cellular responses downward CX3CR1 when

bound to one or another form of CX3CL1 are qualitatively different. Indeed, Kim et al (Kim et al., 2011) showed that only the membrane anchored full-length CX3CL1 was able to rescue the CX3CR1^{hi} blood monocytes from cell death. So we investigated the potential differences between the cellular cAMP responses evoked by both forms of CX3CL1 by measuring cellular cAMP in real time using the Glosensor biosensor. We found that the cAMP-inhibitory signal is lasting more than two-fold longer when evoked by membrane CX3CL1 than by the soluble form. This was shown to be due to the fact that the CX3CR1 receptors bound to membrane CX3CL1 are hardly internalized.

Materials and Methods

Materials and Reagents

Cell culture media were from Gibco – Life technologies. FBS are from Dutscher (Les Ulis, France). Forskolin (FSK), 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and prostaglandin E2 (PGE2), hygromycin, geneticin (G418), are from Sigma-Aldrich. Pertussis toxin (PTX) was from Enzo life sciences. Dynasor was from Calbiochem (Merck Millipore-Guyancourt, France). 96-well clear-bottomed white microplates were from Greiner-Bio-One (Dutscher-Les Ulis, France). JetPei was from Ozyme (Montigny-le Bretonneux, France). The Dual-Luciferase® reporter assay system, pGloSensorTM-22F-cAMP plasmid and GloSensorTM cAMP reagent were purchased from Promega (Charbonnière, France). CX3CL1 chemokine domain and CX3CL1 full length were from R&D systems (Lille, France) while CXCL12, CXCL26 and CCL2 were from Peprotech (Neuilly sur Seine, France). Human CX3CR1-Phycoerythrin antibody, Human CXCR4- Allophycocyanin-conjugated antibody and the IgG2A-APC conjugated isotype were from R&D systems (Lille, France).

Cell Culture

HEK293 and L929 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium plus GlutaMax I (DMEM) supplemented with 10% FBS and 1mM sodium pyruvate. We generate a stable cell line HEK293 expressing human CX3CR1 gene and the bioluminescent sensor GloSensor F-22 (HEK- CX3CR1-Glo). We generate a stable cell line HEK293 expressing human CX3CR1 gene and the bioluminescent sensor GloSensor F-22 resistant to 0.5mg/ml G418 and to 100ng/ml Hygromycin B. We use a stable cell line L929 expressing on their surface the human CX3CL1. This expression is maintained thanks to 0.5mg/ml G418. HBP-ALL and Jurkat cell line are maintained in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI- 1640) supplemented with 10% FBS. The HBP-all cell line used is a stable clone expressing human CX3CR1 gene.

Creation of the HEK-CX3CR1-GloSENSOR cell line

Human HEK293 cells expressing human CX3CR1 gene were transfected with a plasmid encoding an engineered cAMP sensitive luciferase (pGloSensorTM-22F-cAMP plasmid, Promega) by JetPei method (Ozyme). These cells (HEK-CX3CR1-Glo) were grown in 88% DMEM, 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin and streptomycin, geneticin (0.5mg/ml) and hygromycin (100µg/ml). Resistant clones were isolated, expanded and selected for their ability to respond to FSK.

Electroporation of Jurkat cell line and HBP-ALL CX3CR1 cell line

Prior to electroporation, the cells were washed with PBS, counted, and resuspended in RPMI-1640 FBS free to a cell density of 5×10^6 cells/400 μ l in gene pulser® cuvette 4mm (Bio-Rad, Hercules, CA) and mixed with 10 μ g of pGloSensor™-22F-cAMP plasmid. After 10 minutes at room temperature, prior to the delivery of a single electrical pulse at 270V and a capacitance of 950 μ F. The cell suspension was transferred to prewarmed culture medium and incubated for 24h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed using FACSCalibur (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) for acquisition and analysis was performed using Flowjo software (Tree Star, Ashland, OR). HEK- CX3CR1-Glo cells suspension was distributed in 96-round-bottom well plates (5×10^5 /well) in DMEM in the presence of XnM human CX3CR1-PE or CXCR4-APC for 30 minutes at room temperature. Isotype control are used for detect the negative population. We used an IgG2B-PE and an IgG2A-APC. Cells were washed twice in PBS-BSA 0.5% and directly analyzed by flow cytometry. Results are expressed in mean fluorescence intensity (MFI) of PE.

GloSensor assay

The day before the experiment cells expressed the biosensor seeded in 96-well clear-bottomed white microplate in 100 μ l of culture medium were incubated at 37°C, 5% CO₂ overnight. Culture medium was replaced by CO₂ independent medium containing a 2%v/v GloSensor cAMP reagent stock solution and 10% FBS. After 90 minutes of incubation at 37°C, the luminescence was measured using a TRISTAR plate reader (Berthold technologies- Thoiry, France) (100ms integration). The luminescence was recorded before and after injection of the drugs (FSK, chemokine and vehicle). This protocol is valid for the measurement of responses induced by the soluble form of the chemokine. For membrane form of chemokine, we adapted the protocol as following. The day before the experiment, L929 and L-CX3CL1 seeded in 96-well clear-bottomed white microplate in 100 μ l of culture medium and incubated at 37°C, 5% CO₂ overnight. In parallel, the cells expressed the biosensor were seeded in 6-well plate in 2ml of culture medium. The day of the experiment, cells expressed the biosensor were equilibrate in CO₂ independent medium containing a 2%v/v GloSensor cAMP reagent stock solution and 10% FBS. After this step, if the cells expressed CX3CR1 and the biosensor were dispensed in 96-well clear-bottomed white microplate containing L929 cells and FSK.

Results

The cAMP-inhibitory response to chemokines is independent of the cAMP prestimulation way

To explore the cAMP-inhibitory chemokine response, we employed the HEK293 cell line often used to monitor Gs-related cAMP responses (Violin et al., 2008; Leduc et al., 2009; Rosethorne et al., 2010; Nobles et al., 2011) and to analyze the chemokine responses (Combadiere et al., 1995; Myers et al., 1995). From a HEK293 cell clone that constitutively expressed CXCR4 (**Figure 1A**) and that ectopically expressed CX3CR1 (Daoudi et al., 2004) (**Figure 1B**), we obtained a sub-clone stably expressing the luminescent biosensor called GlosensorTM-22F (Promega, Charbonnières, France). This biosensor consists in a recombinant firefly luciferase coupled to the PKA cAMP-binding domain, where cAMP binding promotes a conformational shift within the biosensor inducing luciferase activity. The HEK subclone expressing the biosensor - hereafter called HEKgloCX3CR1 - exhibited a stimulatory response to Forskolin, a classically used adenylyl cyclase activator (Seamon et al., 1981) (quoted here FSK) (**Figures 1C black trace**). As expected, this FSK response was absent when using the parental HEK293 clone that does not express the biosensor (**Figure 1C black dotted trace**). We also tested a more physiological way to obtain prior cAMP stimulation, i.e. agonists of GPCR coupled to Gs like prostaglandin receptors that are present in HEK293 (Morath et al., 1999; Desai and Ashby, 2001). Addition of PGE2 to HEKgloCX3CR1 gave rise to a signal similar to that evoked by FSK (**Figure 1E, black trace**).

To evidence cAMP-inhibitory responses, the chemokine was added at the time of peak of the FSK or PGE2 response. Using 100 nM of either CX3CL1 (**Figures 1C and 1E, red traces**) or CXCL12 (**Figures 1C and 1E, green traces**), we observed a significant inhibition while the addition of the control chemokine CCL2 left the signals unchanged (**Figures 1C and 1E, blue traces**). So the net responses obtained after addition of CX3CL1 or CXCL12 – i.e. difference between signals obtained in the presence (**Figures 1C and 1E, red and green traces**) or in the absence of chemokines (**Figures 1C and 1E, black traces**) – have similar profiles, the cAMP prestimulatory ligand being FSK (**Figure 1D**) or PGE2 (**Figure 1F**): the chemokine responses reached a peak 8-10 minutes after the chemokine addition and displayed a slow decay that achieved 50% of the peak amplitude after 40- 50 minutes. When expressed as percent of the maximum of the control signals (**Figures 1D and 1F, right side ordinate**), the amplitude of the response to both CX3CL1 and CXCL12 were found around 35-40%. Moreover, we found similar dose-response curves, the prestimulation would be done with either PGE2 or FSK. Finally, we found that responses to both chemokines were suppressed after a Pertussis toxin treatment (**Figures 1D, black and grey traces**) bearing out the chemokine responses are through the Gi-pathway.

Natively, the soluble form of the CX3CL1 chemokine is not the chemokine domain alone as for the other chemokines like CXCL12, but includes a mucin stalk (Bazan et al., 1997). So we checked that the full length soluble CX3CL1 evoked a response similar to that of the

CX3CL1 chemokine domain (**Figure S1**).

We next examined whether the response is conserved when the chemokine is added at different times after the Gs-related ligand (**Figure 2A**) or the FSK (**Figure 2B**). In this case, each response was expressed at percent of the amplitude of the control signal gained at the moment of chemokine addition. We observed that the chemokine responses had similar amplitude and outline (**Figures 2C and 2D**) to that described above (**Figure 1**), whether chemokine was added simultaneously with FSK or PGE2 (**Figures 2C and 2D, black traces**), 3 minutes (**blue traces**), 20 minutes (**green traces**) or 60 minutes (**red traces**) after FSK or PGE2.

The chemokine response was further analyzed according to the amplitude of the cAMP-prestimulatory signal. This was done by using different concentrations of FSK added before the chemokine. The addition of 0.5 μM , 1 μM , 5 μM and 20 μM FSK gave signals with amplitude levels staggering between 300 and 4000 luminescence units (**Figure 3A, thin traces**). In each case, CX3CL1 induced a net inhibitory response (**Figure 3A, bold traces**). When expressed in percent of the control signal, the responses to CX3CL1 were very similar when using FSK concentrations of 0.5 μM or 1 μM (**Figure 3B, black and red traces**), with an amplitude peaking at 25-30%. In the presence of higher FSK concentration, i.e. 5 μM and 20 μM (**Figure 3B, blue and green traces**), the FSK signal was greater than 2000 luminescence units and the amplitude of the subsequent chemokine response was found smaller (5-15%). This was more evident in **Figure 3C (circles)** where the amplitude of the CX3CL1 response was reported versus the FSK concentration used for the prestimulation. This distortion at highest FSK concentration was probably due to the saturation of the biosensor, as indicated by the Glosensor Manufacturer when luminescence exceeds 2000 units. This nonlinear behavior was confirmed here when using a permeant non-hydrolysable cAMP analog (**Figure S2**): at concentration below 0.5 μM , the amplitude of the signal was lower than 2000 and linear versus the cAMP analog concentration. Using concentration of the cAMP analog above 0.5 μM , the amplitude of the observed signal began to saturate.

In the other hand, using FSK concentration lower than 50nM gave chemokine responses with a signal-to-noise ratio lower than 10 (**Figure 3C, right side ordinate**) rendering the analysis less easy. So we decide to work hereafter with FSK concentration in the 0.05-1 μM range. Taken together, our data indicate that the chemokine response was robust and did not depend on the nature of the prestimulatory compounds, nor of the time of addition of the chemokine, when keeping the signal in the linear range of the biosensor activity.

According to the study of Gs-mediated cAMP-stimulatory responses, the cellular phosphodiesterases are involved in both limiting the amplitude of the responses and allowing their rapid decline. As expected, the addition along with FSK of IBMX, a non-selective phosphodiesterase inhibitor, gave a considerably increased signal (**Figure 4A, black trace**). However, the amplitude of responses to both CX3CL1 and CXCL12 expressed as percent of control (**Figures 4B and 4C, black traces**) remained similar to that observed in absence of IBMX (**Figures 4B and 4C, grey traces**), the response kinetics being slightly slowed down: the maximum of the response appears only after 25 minutes instead of 8-10 minutes and the response decay achieved 50% of the peak amplitude after more than 90 minutes. The

same picture was obtained when using alone IBMX at a concentration giving a signal equivalent to the FSK signal (**Figure S3**).

Similar responses are obtained with other chemokines and in other cell lines

Using HEK293 clones transitory transfected with CXCR6 or CCR2 along with the Glosensor, we obtained responses to CXCL16 and CCL2 (**Figure 5, grey traces**) which were akin to that of CX3CL1 and CXCL12 (**Figure 1**) and were both suppressed after Pertussis Toxin treatment (**Figure 5 black traces**). Moreover, similar response to both chemokine was also found in lymphocytic cell lines like the Jurkat (**Figure S4A**) and HPB-ALL (**Figure S4B**). However, the FSK signals in these cell lines were very small as compared to the ones obtained in HEK293, giving chemokine responses with larger noise. This was probably due to the hard biosensor transfection in such cell lines.

Absence of cross desensitization between responses to different chemokines

Since chemokines seem to share the same signaling machinery, we wonder whether the addition of one chemokine might suppress the subsequent response to another. While after a full response to CX3CL1, a second addition of CX3CL1 gave not signal at all (**Figure 6A**, trace a, bold arrows), a second addition of CXCL12 gave a clear response (**Figure 6A**, trace b, empty arrow). A similar picture was observed in the reverse case, i.e. when the CX3CL1 addition followed the CXCL12 addition (**Figure 6A**, trace c). Moreover, the individual CX3CL1 responses expressed as percent of the control at the time of the chemokine addition were similar, whether the CX3CL1 was added first (**Figure 6B**, red trace corresponding to trace a), after CXCL12 (**Figure 6B**, green trace corresponding to trace c) or after the control chemokine CCL2 (**Figure 6B**, blue trace corresponding to trace d). The same picture was also found for CXCL12 responses (**Figure 6C**). This indicates (i) that there was no crossed desensitization between responses to two different chemokines and (ii) that the intracellular machinery was not the limiting factor to the amplitude of the response to individual chemokine. To confirm this latter deduction, we performed simultaneous addition of CX3CL1 and CXCL12 (**Figure 6A**, trace f). As expected, this gave a signal greater than those obtain to single chemokine (more than 50%); however its amplitude did not clearly correspond to the mere addition of both single responses.

Soluble and membrane forms of CX3CL1 evoke responses with different kinetics

To monitor cellular responses to the membrane form of CX3CL1, we needed to work with CX3CR1-positive cells in suspension. So we first checked that suspended HEKgloCX3CR1 cells display the same response than when adherent. We indeed found that both amplitude and outline of the response were similar (**Figure S5A**), as well as the dose-

response curve (**Figure S5B**). Then we monitored the signal produced by suspended HEK293 deposited on a cell layer of L929 cells expressing or not CX3CL1 (**Figure 7A insert**) in the presence of FSK. We did observe a net inhibitory response in the presence of membrane CX3CL1 (**Figure 7A, compare bold and thin traces**). This response was reported as percent of control in **Figure 7B (black trace)**. Its amplitude was comparable to that obtained with the soluble CX3CL1 on the same cells (**Figure 7B, grey trace**), but with a very slower kinetics: it peaked only 25-35 minutes after the chemokine addition, and more than 90 minutes were needed to observe a signal back to 50% of the maximum.

One could argue that this signal slowness could be due to the limiting time of HEKgloCX3CR1 cells landing to the L929 cells at the bottom of each well. So we doubled the volume in which HEKgloCX3CR1 cells were suspended, expecting a slower response: this was not the case; we observed that the kinetics of the response remained unchanged (**Figure S6**). Another alternative explanation could be the cleavage of the membranous CX3CL1 on the L929 cells giving a continuous source of soluble CX3CL1. We therefore analyzed the supernatant of these L929 cells expressing or not CX3CL1: we found the first did not contain any detectable CX3CL1 while the CX3CL1-positive L929 secrete less than 0.1pM of CX3CL1 after 2 h of incubation. This was confirmed by adding supernatant of CX3CL1-positive L929 to HEKgloCX3CR1 (**Figure S7**): we did not observe any significantly differential signal using supernatants after 15 min or 60 minutes of incubation. The 120 min-supernatant gave a very slight signal, which amplitude was less than 7% of the control. So the response we observed in the presence of CX3CL1-expressing L929 came actually from the membrane CX3CL1. Finally, the difference between responses to both forms of CX3CL1 were clearly illustrated by successive action of both ligands (**Figure 7A, bold and grey trace**): adding soluble CX3CL1 after 45 minutes gave a response that was faster than the response to the membrane CX3CL1; the first is finished when the second is still under course.

Role of receptor internalization in the dynamics of the chemokine response

The possible role of the internalization of the chemokine receptor in shaping the cAMP-inhibitory response was first investigated using the CX3CR1 antagonist F1 we recently identified (Dorgham et al., 2009). We first showed that the F1 was a competitive antagonist regarding the CX3CL1-evoked cAMP-inhibitory response (**Figure S8A**) as found using the intracellular calcium signaling (Dorgham et al., 2009): as hallmark of the competitive inhibition, the double-reciprocal plot gave the same intercept in the presence of in the absence of inhibitor (**Figure S8B**).

Adding a saturating concentration of F1 along with the chemokine effectively suppressed the response (**Figure 8A, compare traces a and b**). When added 8 minutes or 16 minutes after CX3CL1, the antagonist elicited a rapid return to zero of the signal and shortened the response (**Figure 8A, traces c and d**). By contrast, F1 addition after the response peak, i.e. at 30 or 90 minutes, had no effect (**Figure 8A, traces e and f**), indicating that the receptors possibly involved in the continuing response are no more accessible to the external antagonist. Consistently, we found that the surface CX3CR1 decreased during 30 minutes after CX3CL1

addition and remain stable until 90 minutes (**Figure 8B, black dots**).

Then we used Dynasore, an inhibitor of the dynamin-mediated receptor internalization (Kirchhausen et al., 2008; Huang, 2009 #12902}). After treatment with such compound, the CX3CR1 internalization was indeed completely abolished (**Figure 8B grey dots**). Such a treatment remained the cAMP-inhibitory response unchanged regarding its onset, while its decay was significantly slowed down (**Figure 8C**). The same picture was obtained with the CXCL12 response (**Figure S9**).

In contrast to the soluble form of CX3CL1, the membrane form is not expected to induce the CX3CR1 internalization (**Figure 9**).

Discussion

The present work shows that the use of cAMP biosensor is a valuable tool to delineate the cAMP- inhibiting responses downward chemokine receptors and especially here downward CX3CR1, stimulated by either soluble or membrane forms of its natural ligand, CX3CL1. Such biosensors based on luminescence {Nobles, 2011 #15693} or FRET techniques (Nikolaev et al., 2004; Ponsioen et al., 2004; Nikolaev et al., 2006; van der Krogt et al., 2008; Depry et al., 2011) were largely used to decipher the temporal dynamics of the Gs-mediated (Allen and Zhang, 2006; Klarenbeek et al., 2011) or Gq-mediated (Shen et al., 2012; Shen and Cooper, 2013) cAMP- related stimulatory signal. However, the Gi-mediated cAMP-inhibitory signals are rarely monitored in such a way (see (DiRaddo et al., 2014)). Some studies used the 22F-GloSensorTM cAMP- luminescent biosensor to quantify the Gi-mediated responses in HEK293 cells but only in an end- point manner (Nobles et al., 2011; Gilliland et al., 2013); we used it to monitor its kinetics. We primarily found that the responses evoked by

chemokines expressed as percent of inhibition were remarkably conserved regarding either its amplitude than its kinetics. The chemokine response seems limited to 30-40% inhibition regardless the prestimulation way (**Figures 1, 3-4, S3**), the time of chemokine addition (**Figure 2**), the cellular configuration (suspended or adherent) (**Figure S5**) and the cell type (**Figure S4**). This amplitude is of the same order of the amplitude of chemokine Gi-mediated response already found by conventional assays of cellular cAMP (Myers et al., 1995; O'Boyle et al., 2007 ;Shyamala et al., 1998)

As expected, the main limiting factor to observe such cAMP-inhibitory responses is the sensitivity and the linear dynamic range of the biosensor: the prestimulation signal should be enough great to allow the observation of the cAMP-inhibiting response (50 nM FSK in our case, **Figure 3C**) and not too high to remain in the linear range of the biosensor and avoid its saturation (1 μ M FSK, **Figure 3C**). This globally matches with the dynamic range of the 22F-GloSensorTM recently described (Binkowski et al., 2011) and illustrated in **Figure S2**, i.e. in the cAMP concentration of 10^{-9} - 5.10^{-7} M.

The activity level of a biosensor such the cAMP-related GloSensor in a cellular context is controlled by several parameters, the first being the apparent affinity of the biosensor binding domain for its metabolite. It is relatively easy to know the on-rate of such cAMP biosensor by using permeant and non-hydrolysable cAMP analogues (**Figure S2**). However, the limiting step to monitor a cAMP-inhibitory response with such biosensor is the off-rate of cAMP from the biosensor site, and this reaction is less easy to test. We found here that the Gi-mediated chemokine response peaked after 8-10 minutes of chemokine stimulation. This is relatively slower than the onset of the Gs-mediated responses like those evoked by PGE2 (**Figure 1E**) or by beta-adrenergic ligands (Binkowski et al., 2011) that peaked 4-6 minutes after ligand addition. So it is not impossible that the cAMP desorption from GloSensor could limit in some extent the onset of cAMP-inhibitory responses. Anyway, the fact that chemokines, and especially CX3CL1, triggered intracellular transducing events lasting more than 30 minutes was classically found regarding for instance ERK phosphorylation (Cambien et al., 2001).

The second parameter involved in the dynamic response of the Glosensor is the turnover of the cellular cAMP produced by cyclase and degraded by phosphodiesterases. More rapid is this turnover, greater is the time of response of the Glosensor to a drop of cellular cAMP concentration. This could explain why the chemokine response appeared here slower in both onset and decline in the presence of IBMX (**Figures 4 and S3**).

The compartmentation of cellular cAMP was also a major parameter that governs the shape of the responses monitored using biosensors, as clearly shown for cAMP-stimulating responses (Agarwal et al., 2014). Indeed diverse responses kinetics could be observed according the cell localization of the biosensor, whether it is soluble or membrane-tethered (Willoughby and Cooper, 2008) or associated in raft or non-raft microdomains (Agarwal et al., 2014). The 22F-GloSensorTM here used is derived from the PKA-cAMP binding site (Binkowski et al., 2011) and is presumably soluble and hence responds to changes in cAMP occurring throughout the cytosolic compartment of cell. If chemokine-elicited cAMP-inhibitory responses are confined to some subcellular compartment confined by the co-localization of receptors, Gi-proteins,

adenylyl cyclases and phosphodiesterases in a “receptosome” as shown for cAMP-stimulatory responses, the signals we observed is only the integration of many local responses, with delayed kinetics and average amplitudes. Using a membrane-associated biosensor might give access to such subcellular responses as recently shown for cAMP-stimulatory responses (Agarwal et al., 2014).

Regardless the actual localization of the biosensor we used here, it remains that the phosphodiesterases appeared to have a great role to shape the observed signal. In the presence of their inhibitor IBMX, the cAMP-associated signal increased ten-fold in the presence of FSK (**Figure 4A**). More significantly, the resting signal increased more than 100-fold (**Figure S3**), indicating that the cellular cAMP concentration is a result of a basal adenylyl cyclase activity counterbalanced by a high phosphodiesterase activity. So in the conditions where phosphodiesterase are inhibited (in the presence of IBMX), one could expect that the cellular cAMP is continuously growing, and that the partial Gi-mediated inhibition of the cAMP production by adenylyl cyclase could not give a net decrease in the cellular cAMP concentration. Nevertheless, such responses are yet observed (**Figures 4A and S3**). This could mean that phosphodiesterases insensitive to IBMX could exist in HEK293, or that cells could reduce its cellular cAMP by other way still to be described.

The main results we obtained here is the conserved amplitude of the chemokine response to 35-40% no matter the way used for the prestimulatory phase. By comparison, a recent study found that responses downward metabotropic glutamate receptors assayed with the same biosensor in CHO reached 80% (DiRaddo et al., 2014). In our case, we show that the intracellular signaling machinery is not limiting since adding two different chemokines at the same time give greater responses than individual ones (**Figure 6, trace f**). Moreover, adding sequentially two different chemokines give two individual responses (**Figure 6, traces b and c**), while adding sequentially the same chemokine gives only one response: the receptors saturated by the first addition are not available to transduce signal by the second addition (**Figure 6, trace a**). So the limiting step explaining why the chemokine response never exceeds the 40% level is most probably the number of available surface chemokine receptors. This is further evidenced by the use of the competitive CX3CL1 antagonist: the amplitude of the response obviously follows the rate of the receptor occupancy by the agonist CX3CL1 (**Figure S8**). Moreover the addition of an antagonist concentration sufficient to displace CX3CL1 during the onset of the response results in a rapid return to basal line of the signal (**Figure 8A**), indicating that the number of liganded receptors directly governs the response profile.

The use of biosensors allows to demonstrate an important paradigm shift in GPCR signaling, in that some receptor-evoked Gs-mediated cAMP production persists even after receptor internalization by signaling from endosomes (Calebiro et al., 2009; Ferrandon et al., 2009);(Kuna et al., 2013);(Wehbi et al., 2013; Irannejad and von Zastrow, 2014);(Villardaga et al., 2014). This was also shown for a Gi-dependent signal downward the S1P₁ receptor (Mullershausen et al., 2009). It was therefore important to evaluate the potential existence of such signaling from internalized chemokine receptors in our model, especially as it is controversial whether this unclassical persistent signaling exists in HEK293 (Werthmann et

al., 2012);(Geras-Raaka et al., 2013). However, it seems that the onset of the chemokine response follows the kinetics of internalization (**Figures 8A and 8B**). Moreover this hypothetical of persistent endosomal signaling would be suppressed in conditions where the receptor internalization is inhibited (Villardaga et al., 2014): this is clearly not the case here (**Figure 8C**). So we conclude that the chemokine responses we observed in HEK293 are mainly driven by the available surface cognate chemokine receptors.

The biosensor technique was shown here useful to investigate a response in one cell type in the presence of another cell type interacting with the former. This assay clearly revealed that the membranous form of the CX3CL1 chemokine exhibited significantly longer cAMP-inhibitory response than its soluble form (**Figure 7**). It would be interesting to investigate whether such qualitative difference between responses to both forms of CX3CL1 also exist for activation of others transduction pathways involving ERK, PI3K or Akt activation. It was indeed interesting to note that some functional responses were found to be original to the CX3CL1 membrane form, e.g IFN γ secretion (Yoneda et al., 2003) or rescue from cell death (Kim et al., 2011).

Anyway, in the case of the cAMP-inhibitory response, our data strongly indicated that the difference between responses to both forms of CX3CL1 was due to a net difference in receptor internalization. Indeed we showed that the CX3CR1 liganded by the membrane CX3CL1 was hardly internalized, if any (**Figure 9A**). So the inability to internalize of the CX3CR1 receptors bound to membrane CX3CL1 maintains their ability to transmit signal leading to cAMP-inhibitory responses. The final and slow decline beyond 60 minutes of the response elicited by the membranous chemokine could come from two processes: the hard CX3CR1 internalization following a slow cleavage of membrane CX3CL1 and the progressive inactivation of the receptors by the classical way involving phosphorylation and binding of arrestin.

As mentioned in the Introduction part, the contribution of the cAMP second messenger in the functional role of chemokines remains controversial. It seems not involved in the signal leading to chemotaxis (Jarnagin et al., 1999). Reciprocally, cellular cAMP production could either decrease the chemokine-induced chemotactic activity of monocytes through PKA (Fine et al., 2001; O'Boyle et al., 2007) or increase it through EPAC (Lorenowicz et al., 2006). Moreover, the same cAMP- EPAC way seems to contribute to the synthesis of chemokines (Hertz et al., 2009). Similarly, the adhesion of monocytes to HUVEC is largely decreased in the presence of cAMP (Mori et al., 2007; Chigaev et al., 2008), via a way involving PKA and the phosphorylated RhoA (Laudanna et al., 1997). In contrast, the cAMP-EPAC pathway simulates the monocytes adhesion to activated HUVEC (Lorenowicz et al., 2006). Finally, cAMP has been shown to be an important mediator of growth arrest and apoptosis of B and T cells, while it delays apoptosis in neutrophils, most probably via the EPAC activation (Grandoch et al., 2009). In each of these situations, the precise knowledge of the kinetic profile of the chemokine-induced cAMP-inhibitory response could help to decipher the exact role of cAMP and its cellular partners in the chemokine-associated functions.

REFERENCES

Agarwal, S. R., Yang, P. C., Rice, M., Singer, C. A., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Clancy, C.

E. and Harvey, R. D. (2014). Role of membrane microdomains in compartmentation of cAMP signaling. *PLoS ONE* **9**, e95835.

Allen, M. D. and Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 716-721.

Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leucocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.

Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A. and Schall, T. J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**, 640-644.

Binkowski, B. F., Butler, B. L., Stecha, P. F., Eggers, C. T., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Wood, M. G., Encell, L. P., Fan, F. et al. (2011). A luminescent biosensor with increased dynamic range for intracellular cAMP. *ACS chemical biology* **6**, 1193-1197.

Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Gagliani, M. C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani,

L. and Lohse, M. J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7**, e1000172.

Cambien, B., Pomeranz, M., Schmid-Antomarchi, H., Millet, M. A., Breitmayer, V., Rossi, B. and Schmid-Alliana, A. (2001). Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine- induced monocytic cell adhesion. *Blood* **97**, 2031-2037.

Castro, L. R., Guiot, E., Polito, M., Paupardin-Tritsch, D. and Vincent, P. (2014). Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors. *Biotechnol J* **9**, 192-202.

Castro, L. R., Brito, M., Guiot, E., Polito, M., Korn, C. W., Herve, D., Girault, J. A., Paupardin-Tritsch, D. and Vincent, P. (2013). Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol* **591**, 3197-3214.

Chigaev, A., Waller, A., Amit, O. and Sklar, L. A. (2008). Galpha_s-coupled receptor signaling actively down-regulates alpha4beta1-integrin affinity: a possible mechanism for cell de-adhesion. *BMC Immunol* **9**, 26.

Combadiere, C., Ahuja, S. K. and Murphy, P. M. (1995). Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. *J Biol Chem* **270**, 16491-16494.

Daoudi, M., Lavergne, E., Garin, A., Tarantino, N., Debre, P., Pincet, F., Combadiere, C. and Deterre, P. (2004). Enhanced Adhesive Capacities of the Naturally Occurring Ile249-Met280 Variant of the Chemokine Receptor CX3CR1. *J. Biol. Chem.* **279**, 19649-19657.

Depry, C., Allen, M. D. and Zhang, J. (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst* **7**, 52-58.

Desai, S. and Ashby, B. (2001). Agonist-induced internalization and mitogen-activated protein kinase activation of the human prostaglandin EP4 receptor. *FEBS Letters* **501**, 156-160.

DiPilato, L. M., Cheng, X. and Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16513-16518.

DiRaddo, J. O., Miller, E. J., Hathaway, H. A., Grajkowska, E., Wroblewska, B., Wolfe, B. B., Liotta, D. C. and Wroblewski, J. T. (2014). A real-time method for measuring cAMP production modulated by G_q/o-coupled metabotropic glutamate receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **349**, 373-382.

Dorgham, K., Ghadiri, A., Hermand, P., Rodero, M., Poupel, L., Iga, M., Hartley, O., Gorochoy, G., Combadiere, C. and Deterre, P. (2009). An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol* **86**, 903-911.

Ferrandon, S., Feinstein, T. N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J. T., Gardella, T. J. and Vilardaga, J.-P. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* **advance online publication**.

Fine, J. S., Byrnes, H. D., Zavodny, P. J. and Hipkin, R. W. (2001). Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. *Inflammation* **25**, 61-67.

Garton, K. J., Gough, P. J., Blobel, C. P., Murphy, G., Greaves, D. R., Dempsey, P. J. and Raines, E. W. (2001). Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* **276**, 37993-38001.

Geras-Raaka, E., Neumann, S. and Gershengorn, M. C. (2013). Persistent cAMP signaling by TSH receptors revealed by phosphodiesterase inhibition. *Thyroid* **23**, 1484-1489.

Gilliland, C. T., Salanga, C. L., Kawamura, T., Trejo, J. and Handel, T. M. (2013). The Chemokine Receptor CCR1 Is Constitutively Active, Which Leads to G Protein-independent,

{beta}-Arrestin-mediated Internalization. *J. Biol. Chem.* **288**, 32194-32210.

Grandoch, M., Bujok, V., Fleckenstein, D., Schmidt, M., Fischer, J. W. and Weber, A. A.

(2009). Epac inhibits apoptosis of human leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **86**, 847-849.

Hertz, A. L., Bender, A. T., Smith, K. C., Gilchrist, M., Amieux, P. S., Aderem, A. and Beavo,

J. A. (2009). Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 21978- 21983.

Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V. et al. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**, 1186-1195.

Irannejad, R. and von Zastrow, M. (2014). GPCR signaling along the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **27**, 109-116.

Jarnagin, K., Grunberger, D., Mulkins, M., Wong, B., Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Diehl, F., Freedman, R. et al. (1999). Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry* **38**, 16167-16177.

Kim, K.-W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S. A. and Jung, S. (2011). In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* **118**, e156-e167.

Kirchhausen, T., Macia, E. and Pelish, H. E. (2008). Use of Dynasore, the Small Molecule Inhibitor of Dynamin, in the Regulation of Endocytosis. In *Methods in Enzymology* (eds C. J. D. William E. Balch and H. Alan), pp. 77-93: Academic Press.

Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W. J. and Jalink, K. (2011). A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS ONE* **6**, e19170.

Kuna, R. S., Girada, S. B., Asalla, S., Vallentyne, J., Maddika, S., Patterson, J. T., Smiley, D. L., DiMarchi, R. D. and Mitra, P. (2013). Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated endosomal cAMP generation promotes glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **305**, E161-170.

Laudanna, C., Campbell, J. J. and Butcher, E. C. (1997). Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem* **272**, 24141-24144.

Leduc, M., Breton, B., Gales, C., Le Gouill, C., Bouvier, M., Chemtob, S. and Heveker, N. (2009). Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **331**, 297-307.

Lohse, M. J., Nuber, S. and Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacological Reviews* **64**, 299-336.

Lorenowicz, M. J., van Gils, J., de Boer, M., Hordijk, P. L. and Fernandez-Borja, M. (2006). Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis. *J Leukoc Biol* **80**, 1542-1552.

Ludwig, A. and Weber, C. (2007). Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost* **97**, 694-703.

Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M. H., Broadway, N., Andrews, R. C., Bickett, D. M., Leesnitzer, M. A. and Becherer, J. D. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**, 161-171.

Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M. J., Pozzan, T. et al. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circulation research* **95**, 67-75.

Morath, R., Klein, T., Seyberth, H. W. and Nusing, R. M. (1999). Immunolocalization of the four prostaglandin E2 receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **10**, 1851-1860.

Mori, D., Ishii, H., Kojima, C., Nitta, N., Nakajima, K. and Yoshida, M. (2007). Cilostazol inhibits monocytic cell adhesion to vascular endothelium via upregulation of cAMP. *J Atheroscler Thromb* **14**, 213-218.

Moser, B. and Loetscher, P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* **2**, 123-128.

Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D. and Seuwen, K. (2009). Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized SIP1 receptors. *Nat Chem Biol* **5**, 428-434.

Myers, S. J., Wong, L. M. and Charo, I. F. (1995). Signal Transduction and Ligand Specificity of the Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor in Transfected Embryonic Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 5786-5792.

Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. and Lohse, M. J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 37215-37218.

Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M. J. and Engelhardt, S. (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circulation research* **99**, 1084-1091.

Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Huang, T. Y., Bressler, E. A., Hara, M. R. et al. (2011). Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Science signaling* **4**, ra51.

O'Boyle, G., Brain, J. G., Kirby, J. A. and Ali, S. (2007). Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2. *Mol Immunol* **44**, 1944-1953.

Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar,

W. H., Bos, J. L. and Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* **5**, 1176-1180.

Rich, T. C. and Karpen, J. W. (2002). Review article: cyclic AMP sensors in living cells: what signals can they actually measure? *Ann Biomed Eng* **30**, 1088-1099.

Rich, T. C., Fagan, K. A., Tse, T. E., Schaack, J., Cooper, D. M. and Karpen, J. W. (2001). A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13049-13054.

Rosethorne, E. M., Turner, R. J., Fairhurst, R. A. and Charlton, S. J. (2010). Efficacy is a contributing factor to the clinical onset of bronchodilation of inhaled beta(2)-adrenoceptor agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.

Rot, A. and Von Andrian, U. H. (2004). Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokinese Grammar for Immune Cells. *Ann Rev Imm.* **22**, 891-928.

Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J. W. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3363-3367.

Shen, J. X. and Cooper, D. M. F. (2013). AKAP79, PKC, PKA and PDE4 participate in a Gq-linked muscarinic receptor and adenylate cyclase 2 cAMP signalling complex. *Biochemical Journal* **455**, 47-56.

Shen, J. X., Wachten, S., Halls, M. L., Everett, K. L. and Cooper, D. M. F. (2012). Muscarinic receptors stimulate AC2 by novel phosphorylation sites, whereas G $\beta\gamma$ subunits exert opposing effects depending on the G-protein source. *Biochemical Journal* **447**, 393-405.

Shi, G., Partida-Sanchez, S., Misra, R. S., Tighe, M., Borchers, M. T., Lee, J. J., Simon, M. I. and Lund, F. E. (2007). Identification of an alternative G α_q -dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. *J. Exp. Med.* **204**, 2705-2718.

Sutherland, E. W. (1972). Studies on the mechanism of hormone action. *Science* **177**, 401-408.

van der Krogt, G. N., Ogink, J., Ponsioen, B. and Jalink, K. (2008). A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS ONE* **3**, e1916.

Vilardaga, J. P., Jean-Alphonse, F. G. and Gardella, T. J. (2014). Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nature chemical biology* **10**, 700-706.

Vilardaga, J. P., Bunemann, M., Feinstein, T. N., Lambert, N., Nikolaev, V. O., Engelhardt, S., Lohse, M. J. and Hoffmann, C. (2009). GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells. *Molecular endocrinology* **23**, 590-599.

Viola, A. and Luster, A. D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 171-197.

Violin, J. D., DiPilato, L. M., Yildirim, N., Elston, T. C., Zhang, J. and Lefkowitz, R. J. (2008). beta2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *The Journal of biological chemistry* **283**, 2949-2961.

Wehbi, V. L., Stevenson, H. P., Feinstein, T. N., Calero, G., Romero, G. and Vilardaga, J.-P. (2013). Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-G{beta}{gamma} complex. *PNAS* **110**, 1530-1535.

Werthmann, R. C., Volpe, S., Lohse, M. J. and Calebiro, D. (2012). Persistent cAMP signaling by internalized TSH receptors occurs in thyroid but not in HEK293 cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 2043-2048.

Willoughby, D. and Cooper, D. M. (2008). Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nature methods*

5, 29-36.

Yoneda, O., Imai, T., Nishimura, M., Miyaji, M., Mimori, T., Okazaki, T., Domae, N., Fujimoto, H., Minami, Y., Kono, T. et al. (2003). Membrane-bound form of fractalkine induces IFN-gamma production by NK cells. *Eur J Immunol* **33**, 53-58.

Figure legends

Figure 1. The cAMP-inhibitory responses triggered by chemokines.

(A) Expression of CXCR4 on the HEKgloCX3CR1 clone cells visualized by flow cytometry after staining of cells with anti-CXCR4 (grey trace) or control isotype antibodies (black traces). **(B)** Flux cytometry to visualize CX3CR1 expression on the HEKgloCX3CR1 clone cells after staining with CX3CR1 antibodies (grey trace) or antibodies against control isotype (black trace).

(C) Luminescence signal obtained either in the HEK293 parental cell line (black dotted trace) or in the HEKgloCX3CR1 clone after addition of 0.5 μ M FSK 3 min after reading (black arrow). 30 minutes after (grey arrow), was added either vehicle (black trace), 100 nM CCL2 (blue trace), 100 nM CX3CL1 (red trace) or 100nM CXCL12 (green trace). (D) The signals observed in A with CX3CL1 (red trace) or CXCL12 (green trace) were subtracted from the signal obtained with vehicle (black trace in A) and were expressed either as luminescence unit (left ordinate) or as percent of the maximum of the control signal. The responses to CX3CL1 and CXCL12 observed after pretreatment with Pertussis toxin (100 ng/ml, 4h) were reported (gray and black traces, respectively). (E) Luminescence signal obtained in the HEKgloCX3CR1 clone after addition of 0.4 μ M PGE₂ 3 min after reading (black arrow). 30 minutes after (grey arrow), was added either vehicle (black trace), 100 nM CCL2 (blue trace), 100 nM CX3CL1 (red trace) or 100nM CXCL12 (green trace). (F) Representation of the response observed with CX3CL1 (red trace) or CXCL12 (green trace) subtracted from the signal obtained with vehicle (black trace in A) and were expressed either as luminescence unit (left ordinate) or as percent of the maximum of the control signal.

Figure 2. .The profile of the CX3CL1-triggered cAMP-inhibitory response is independent of the time of chemokine addition after the pre-stimulating compound.

(A and B). Luminescence signal obtained in the HEKgloCX3CR1 clone cells after addition of 0.12 μ M PGE₂ (A) or 0.5 μ M de FSK (B). The arrows indicate the different times of addition of the chemokine whose responses are shown in C and D.

(C and D). The signal obtained with 50nM CX3CL1 added simultaneous (black traces), 3 (blue traces), 20 (green traces) or 60 minutes (red traces) after 0.12 μ M PGE₂ (C) or 0.5 μ M de FSK (D)

Figure 3. .The profile of the CX3CL1-triggered cAMP-inhibitory response is independent of the concentration of the pre-stimulating compound.

(A) Luminescence signal obtained in the HEKgloCX3CR1 clone cells after addition of 20 μ M (green traces), 5 μ M (blues traces), 1 μ M (black traces) or 0.5 μ M (red traces) of FSK. The arrows indicate the time of addition of the chemokine, 50nM CX3CL1 (bold traces) or 50nM CCL2, a control chemokine (thin traces). (B) Responses obtained with 50nM CX3CL1 after 50 μ M (green trace), 20 μ M (blue trace), 1 μ M (black trace) or 0.5 μ M (red trace) of FSK. (C) Expression of the maximal AMPc inhibitory response to 50nM of CX3CL1 dependently to the FSK concentration used to pre-stimulate the cells HEKgloCX3CR1 (●). The ratio Signal to noise are reported to ordinate axis (△).

Figure 4. Influence of the PDE inhibition on the FSK and chemokine responses

(A) Luminescence signal obtained in the HEKgloCX3CR1 clone cells after addition of 0.5 μ M FSK (grey traces) or 0.05 μ M FSK supplemented by 0.5mM IBMX (black traces). The arrows indicate the addition of 50nM of CX3CL1 (bold traces) or 50nM of CCL2 (thin traces). B and C. The signal obtained with 50nM of CX3CL1 (B) or 50nM of CXCL12 (C) after 0.5 μ M FSK (grey traces) or 0.05 μ M of FSK supplemented by 0.5mM of IBMX (black trace)

Figure 5. Chemokine responses downstream different chemokine Receptors

(A) Responses to 50 nM CXCL16 (grey trace) or (B) CCL2 (grey trace) in HEK clones stably

expressing CXCR6 (A) or CCR2 (B) and transfected transiently by GloSensor F-22. The black traces are the same responses observed after PTX treatment (100ng/ μ l, 2h).

Figure 6. Luminescent signals obtained after sequential or simultaneous addition of CX3CL1 and CXCL12

(A) Luminescence signals obtained in the HEKgloCX3CR1 clone after addition (grey arrow) of 0.5 μ M FSK. 30 minutes later was added 50 nM of either CX3CL1 (bold black arrows), CXCL12 (empty arrows) or CCL2 (thin arrows). Still 30 minutes later was added one of the CHK at the same concentration (traces a to e). Alternatively, both 50 nM CX3CL1 and 50 nM CXCL12 was added 30 min after FSK (trace f). (B) The CX3CL1 responses observed in A were analyzed as in Figure 1B and reported as percent of the signal gained just before the time of CX3CL1 addition. (C) The CXCL12 responses observed in A were analyzed as in Figure 1B and reported as percent of the signal gained just before the time of CXCL12 addition.

Figure 7. cAMP-inhibitory responses observed using the membrane form of CX3CL1

(A) Luminescence signal obtained in the HEKgloCX3CR1 clone cells filed on 50 000 L929 cells (black thin trace) or L-CX3CL1 (black bold trace). 0.5 μ M of FSK are diled in the well contained the L929 cells or L-CX3CL1. Grey trace represents the signal obtained by HEKgloCX3CR1 stimulated by 50nM of CX3CL1 45minutes after their deposit on L-CX3CL1 cells. *Insert.* Expression of CX3CL1 analyzed by FACS. (B) Comparison of CX3CL1 responses on HEKgloCX3CR1 deposit on 50nM of CX3CL1 soluble form (red trace) or on L-CX3CL1 (black trace). Grey trace represent the combined response induced by the deposit of HEKgloCX3CR1 cells on LCX3CL1 followed by an addition of 50nM CX3CL1 soluble (grey in A).

Figure 8. Impact of the addition of the CX3CR1 antagonist on the CX3CL1 response and kinetic of CX3CR1 internalization.

(A) Responses to 5nM CX3CL1 in the presence of 0.5 μ M FSK (trace a). Simultaneously to CX3CL1 (trace b), 8min (trace c), 15 min (trace d), 30 min (trace e) or 60 min (trace f) after CX3CL1 addition, was added 300 nM F1 (red arrows). (B) CX3CR1 expression at the surface of the HEKgloCX3CR1 clone cells analyzed using flow cytometry at various time (10, 15, 30, 60 and 90 min) after addition of 50nM CX3CL1 without (black circles) or after a 30 minutes treatment with 120 μ M dynasore (green circles). At each time, the data represent the ratio of mean fluorescence intensity obtained in the presence of CX3CL1 to the mean fluorescence intensity obtained in the absence of CX3CL1. The data was analyzed using PRISM 5 (GraphPad Software) giving a characteristic time of 14 min and 59 min, in the absence and in the presence of dynasore respectively. (C) The responses to 50 nM CX3CL1 obtained on HEKgloCX3CR1 cells pretreated (grey trace) or not (black trace) with dynasore (30 minutes, 120 μ M) in the presence of 0.5 μ M FSK.

Figure 9. Kinetic of CX3CR1 internalization in response to the membrane form of CX3CL1

CX3CR1 Expression at the surface of HEKgloCX3CR1 cells deposit during different time on L929 or LCX3CL1

Supplementary figure legends

Figure S1. cAMP response induced by the CX3CL1 chemokine domain or CX3CL1 with its mucin stalk

Response induced by 50 nM of the CX3CL1 chemokine domain alone (black trace) or to full length CX3CL1 (chemokine domain plus mucin stalk) (grey trace) obtained in HEKgloCX3CR1 cells expressed as percent of the maximum of the control signal.

Figure S2. Amplitude of luminescent signal obtained with the cAMP analog Sp-8-br-cAMP

Various concentrations of a membrane-permeant cAMP analog, Sp-8-br-cAMP were added to the wells containing HEK-CX3CR1-GloSENSOR. The maximum of the luminescent signal is reported according to the concentration of analog added in medium. The linearity of the sensor is only true for a concentration less than 0.5 μ M (insert).

Figure S3. Impact of the inhibition of PDE on the chemokine response

(A) Luminescence signal obtained in the HEKgloCX3CR1 clone cells after addition of 0.05 μ M FSK (gray traces) or 0.5mM IBMX (black traces). (B) Responses evoked by 50nM of CX3CL1 in the presence of 0.05 μ M FSK (grey trace) or 0.5mM of IBMX (black trace)

Figure S4. CX3CL1 and CXCL12 cAMP-inhibitory responses observed in different cell lines

(A) Luminescence signal obtained in Jurkat-Tag cells electroporated with GloSensor F-22 and stimulated by 50 μ M of FSK (black trace) 30 minutes after was added either vehicle (black trace) or 100nM CXCL12 (grey trace). Representation of the response induced by CXCL12 (grey trace) subtracted from the signal obtained with vehicle (black trace in A) and were expressed as percent of the maximum of the control signal. (B) Luminescence signal obtained in HBP-CX3CR1 cells electroporated with GloSensor F-22 and stimulated by 50 μ M of FSK (black trace) 30 minutes after was added either vehicle (black trace) or 100nM CX3CL1 (grey trace). Representation of the response induced by CX3CL1 (grey trace) subtracted from the signal obtained with vehicle (black trace in A) and were expressed as percent of the maximum of the control signal.

Figure S5. cAMP response induced by CX3CL1 in the HEKgloCX3CR1 in the adherent state and in the suspended state

(A) AMPc inhibitory response to 50nM of CX3CL1 chemokine domain measured on HEKgloCX3CR1 cells in adherent (black trace) or suspended (grey trace). (B) Dose response curve of CX3CL1 in function of the stat of cells adherent versus suspended.

Figure S6. Effect of dilution on the response observed with membrane CX3CL1

(A) Luminescence signal obtained either in 30 000 HEKgloCX3CR1 resuspended in 60 (continuous traces) or 120 μ l (dotted traces) filed on L929 (grey trace) or LCX3CL1 (black trace) cells. FSK 0.3 μ M filed in the well containing L cells. (B) CX3CL1 response in function of dilution factor.

Figure S7. Responses observed in the HEKgloCX3CR1 cells after addition of the supernatant of L929 (grey trace) or L-CX3CL1 cells incubated 15 min (A), 60 min (B) or

120 min (C) (black traces)

50 000 cells L929 (grey trace) or LCX3CL1 (black trace) are incubated in CO₂ independent medium supplement by 10% of FBS and 1.5% of cAMP GloSensor reactif ® during 15, 60 or 120minutes. Supernatants of these cells are addition on HEKgloCX3CR1 (arrow) after FSK 0.5µM pre-stimulation.

Figure S8. Competitive antagonism of the CX3CR1 antagonist F1 observed on the CX3CL1 cAMP-inhibitory responses

(A) The areas under curves (AUC) of the responses to various CX3CL1 concentrations obtained after 0.5µM FSK stimulation in the presence of various concentration of the F1 compound were reported. The dose-responses curves were analyzed using PRISM 5 (GraphPad Software) giving an EC₅₀ of 0.9 nM, 2.3 nM, 5.6 nM and 11.6 nM using respectively F1 at 0, 10, 50 and 200 nM.
(B) The same data are displayed in the double-inverse configuration, i.e. inverse of AUC versus inverse of CX3CL1 concentration.

Figure S9. Effect of the treatment with dynasore on the cAMP-inhibitory responses observed with CXCL12 in the HEKgloCX3CR1 clone cells.

The responses to 50 nM CXCL12 obtained on HEKgloCX3CR1 cells pretreated (grey trace) or not (black trace) with dynasore (30 minutes, 120µM) in the presence of 0.5µM FSK.

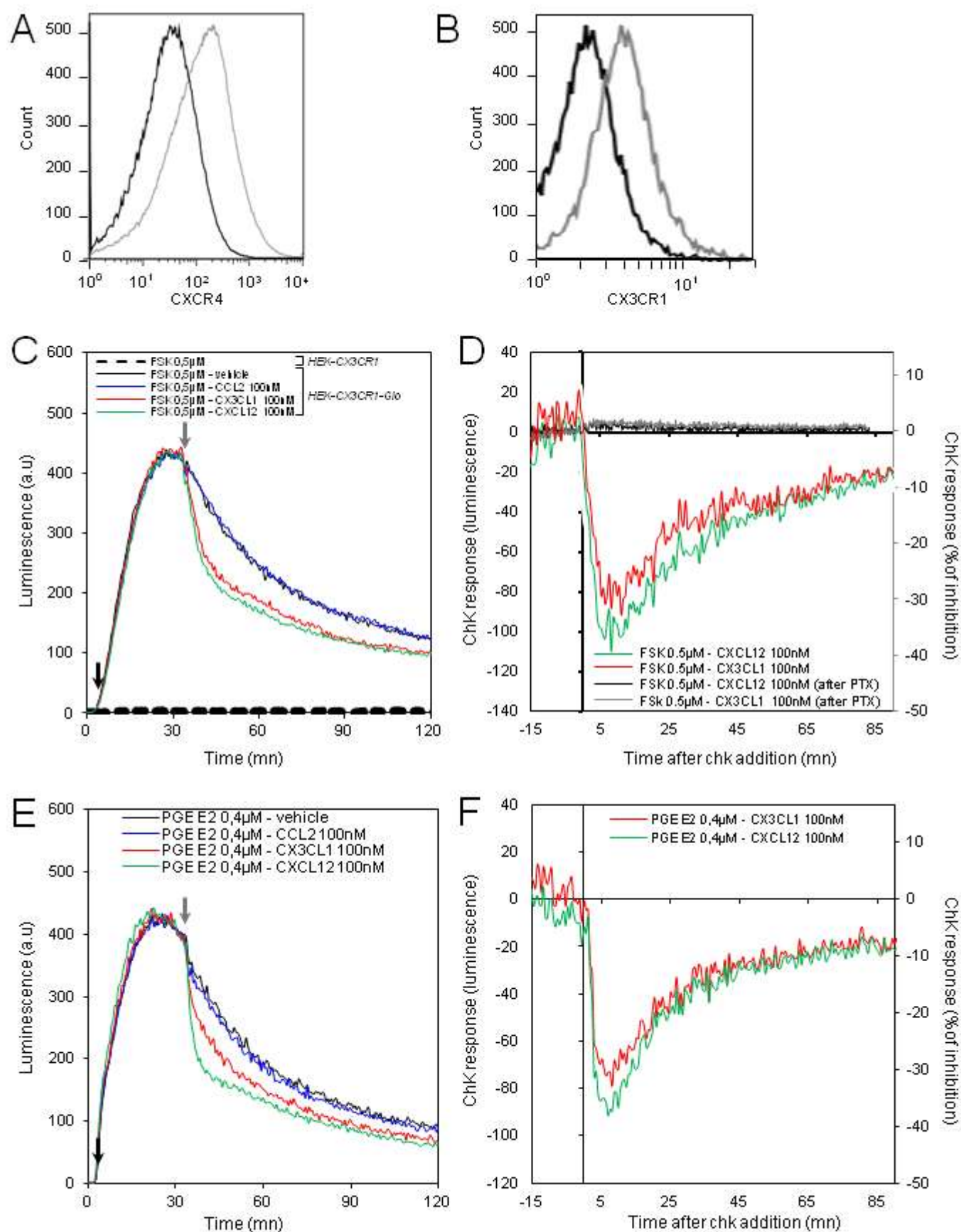
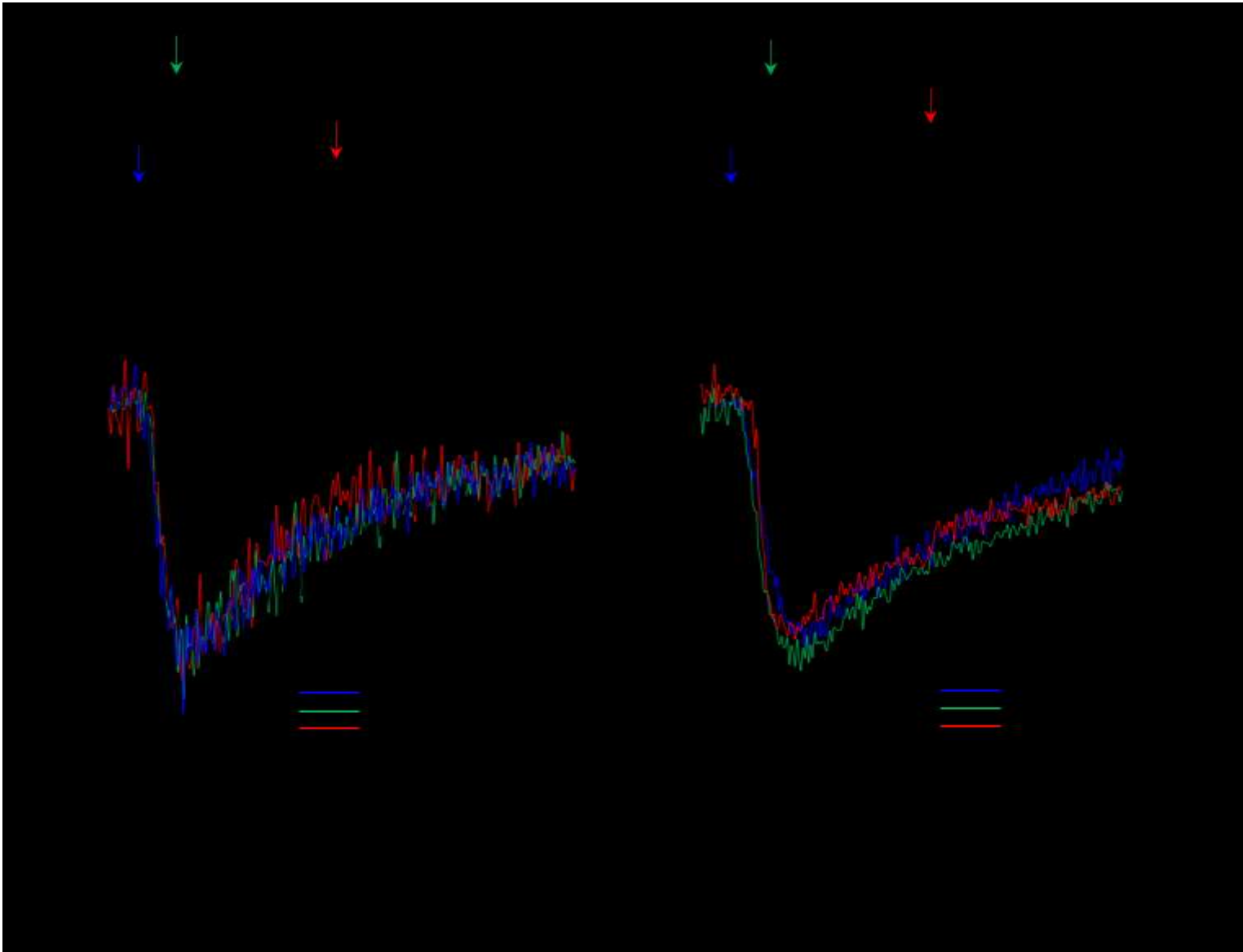


Figure 1. The cAMP-inhibitory responses triggered by chemokines.



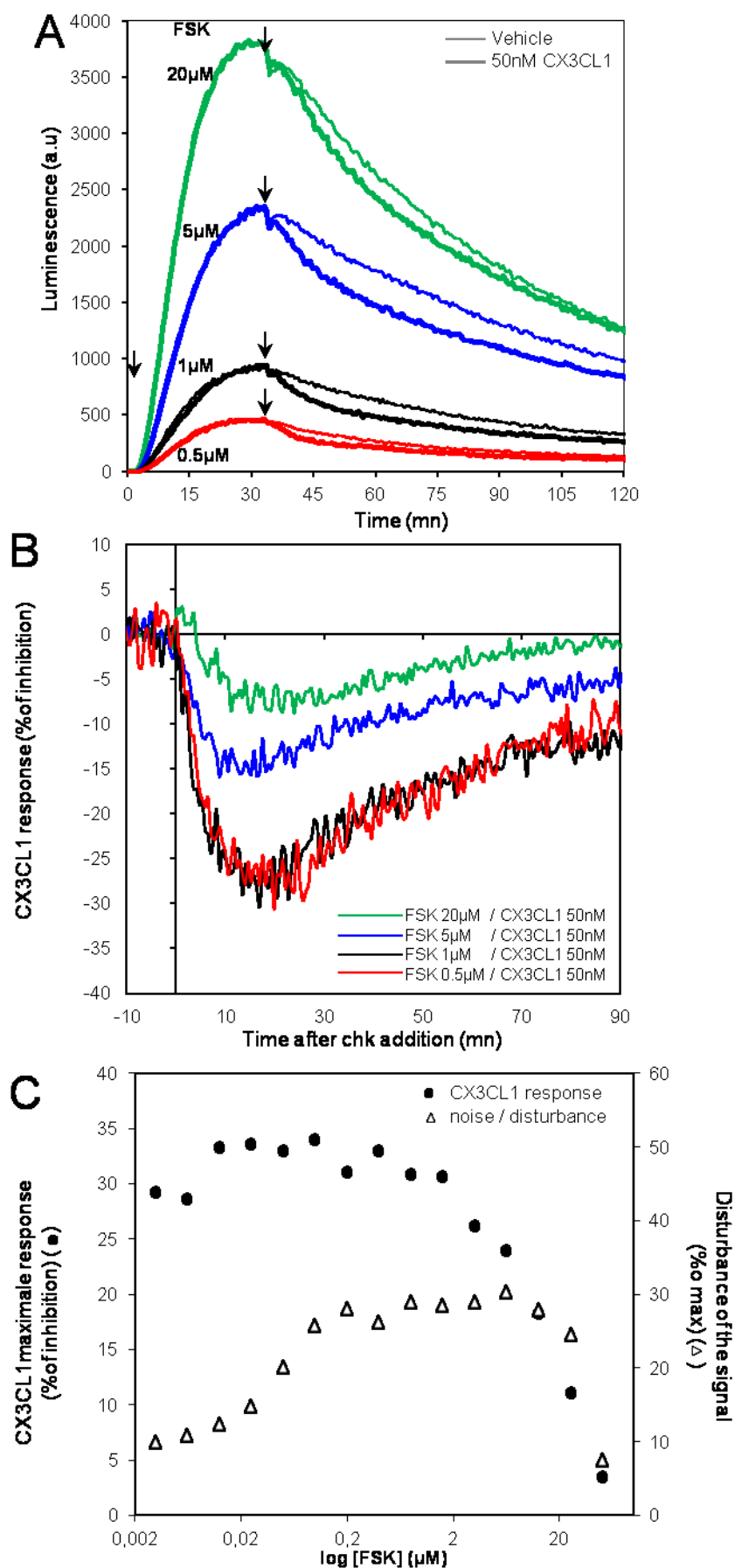


Figure 3. Profile of the CX3CL1-triggered cAMP-inhibitory response is independent of the concentration of the pre-stimulating compound.

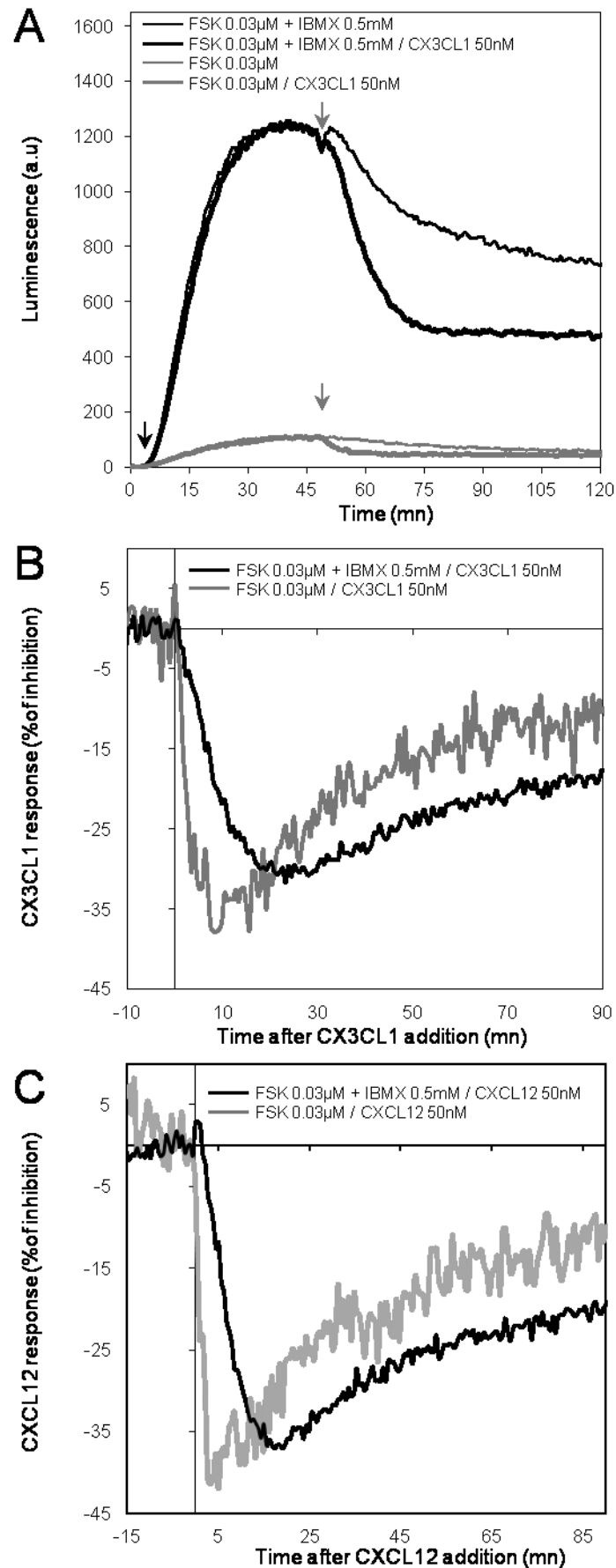


Figure 4. Influence of the PDE inhibition on the FSK and chemokine responses

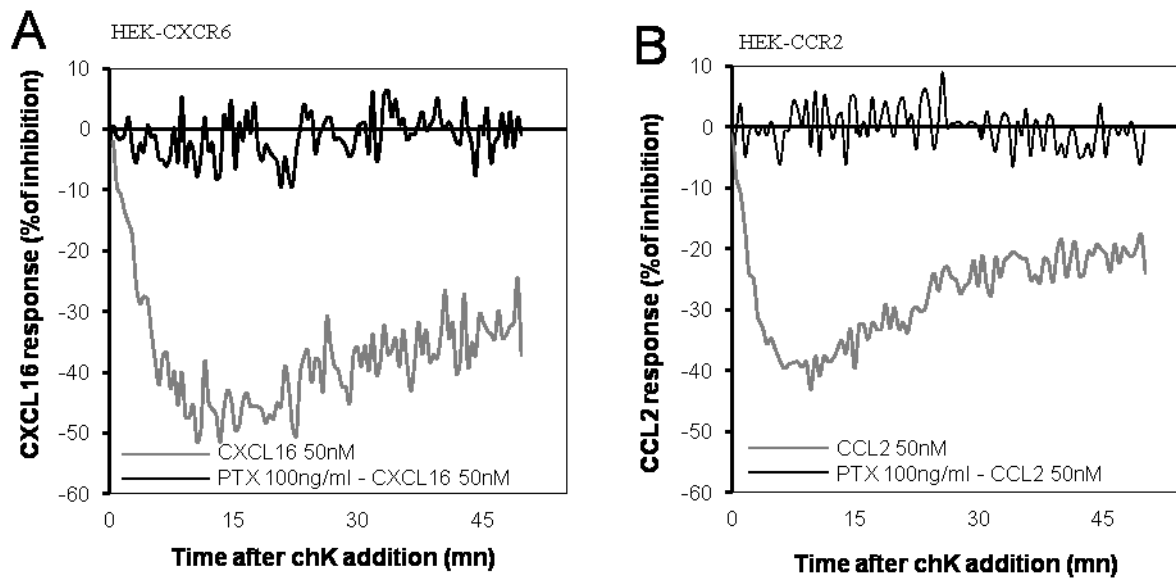


Figure 5. Chemokine responses downstream different chemokine Receptors

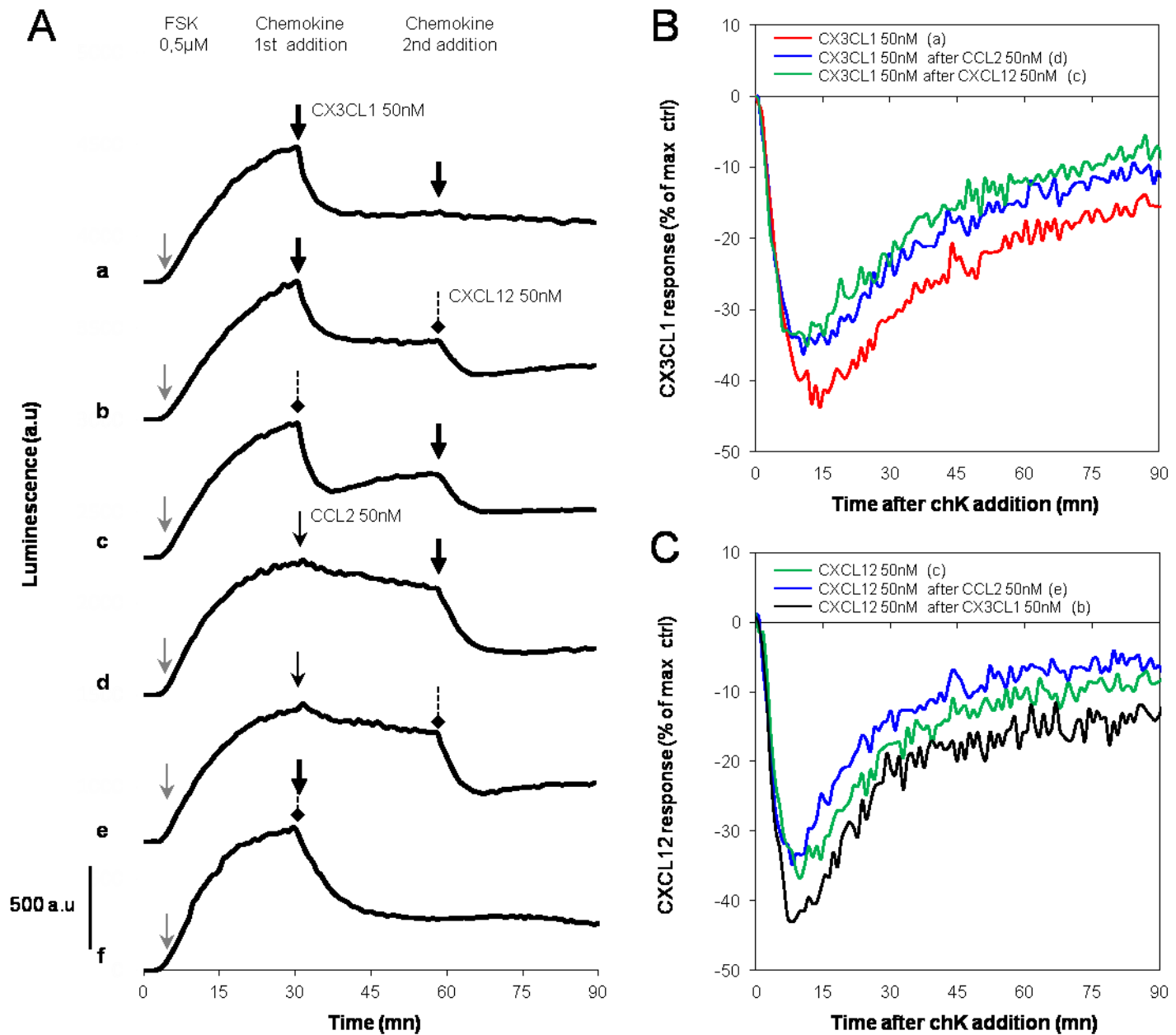


Figure 6. Luminescent signals obtained after sequential or simultaneous addition of CX3CL1 and CXCL12

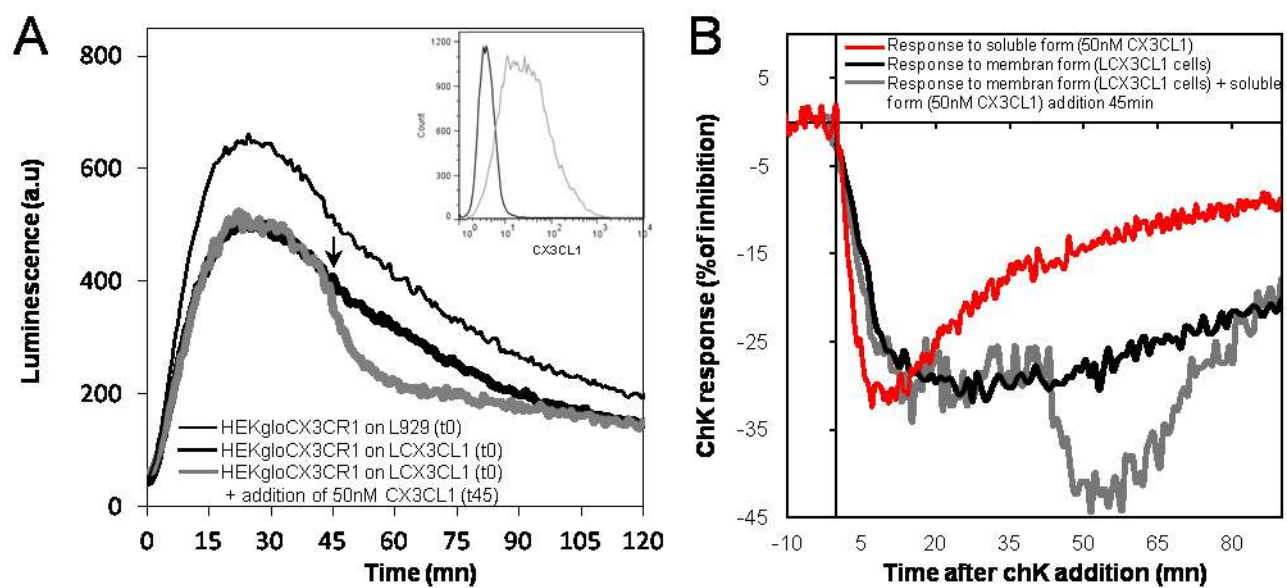


Figure 7. cAMP-inhibitory responses observed using the membrane form of CX3CL1

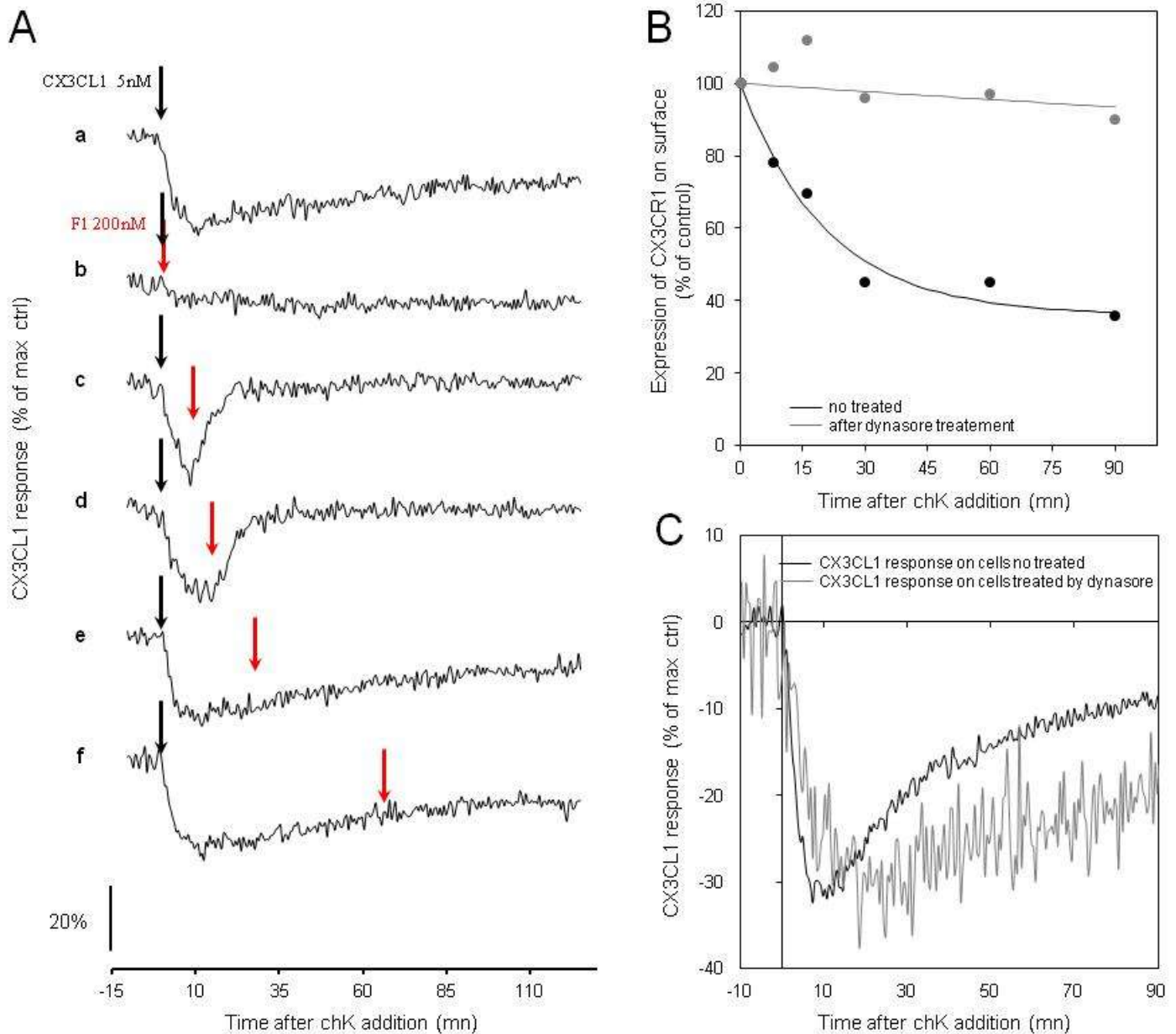


Figure 8. Impact of the addition of the CX3CR1 antagonist on the CX3CL1 response and kinetic of CX3CR1 internalization.

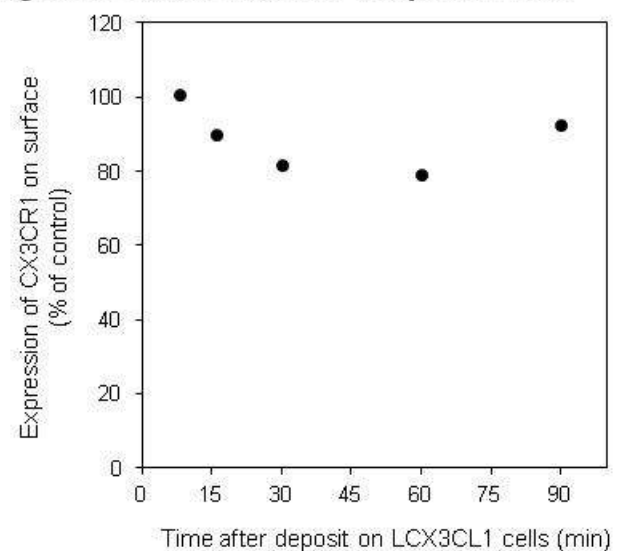


Figure 9. Kinetic of CX3CR1 internalization in response to the membrane form of CX3CL1

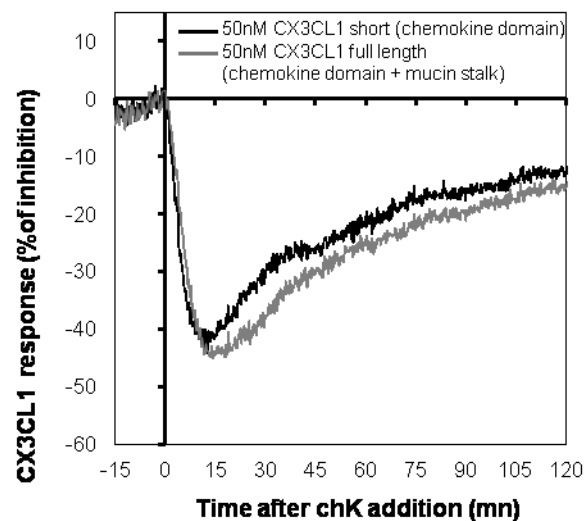


Figure S1. cAMP response induced by the CX3CL1 chemokine domain or CX3CL1 with its mucin stalk

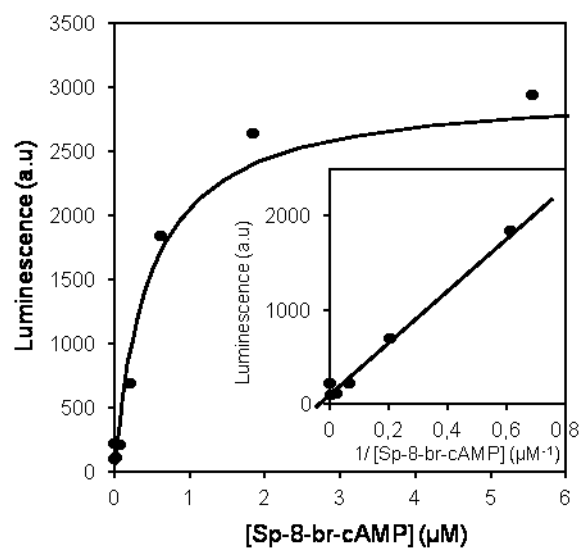


Figure S2. Amplitude of luminescent signal obtained with the cAMP analog Sp-8-br-cAMP

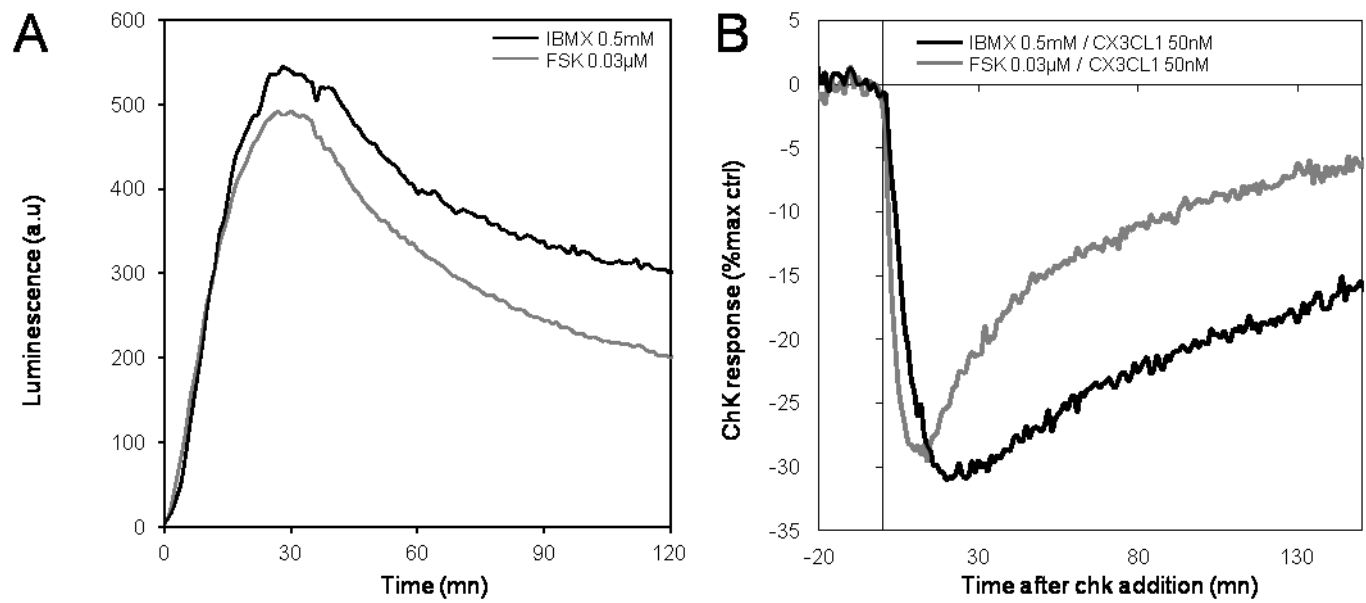


Figure S3. Impact of the inhibition of PDE on the chemokine response

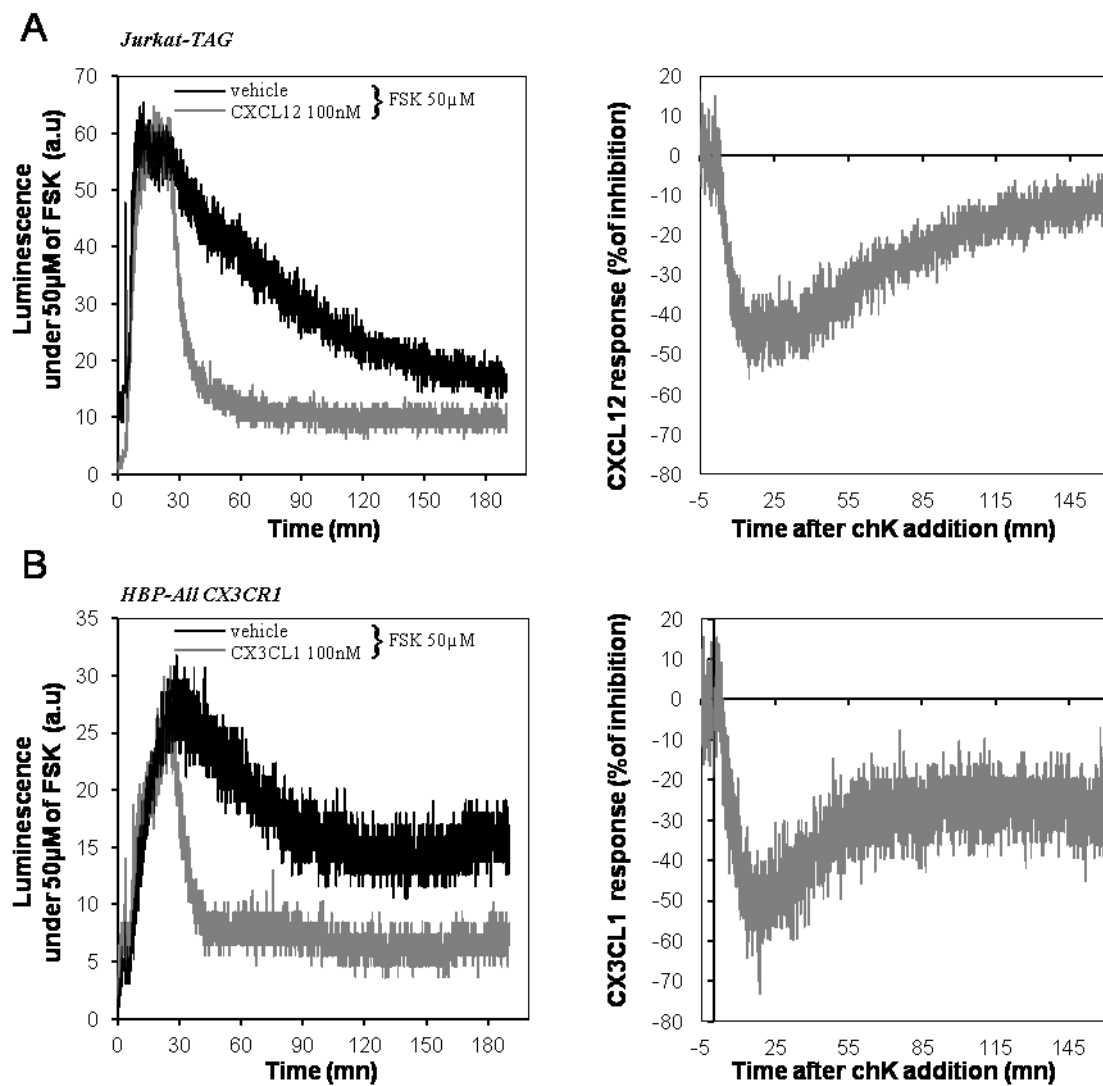


Figure S4. CX3CL1 and CXCL12 cAMP-inhibitory responses observed in different cell lines

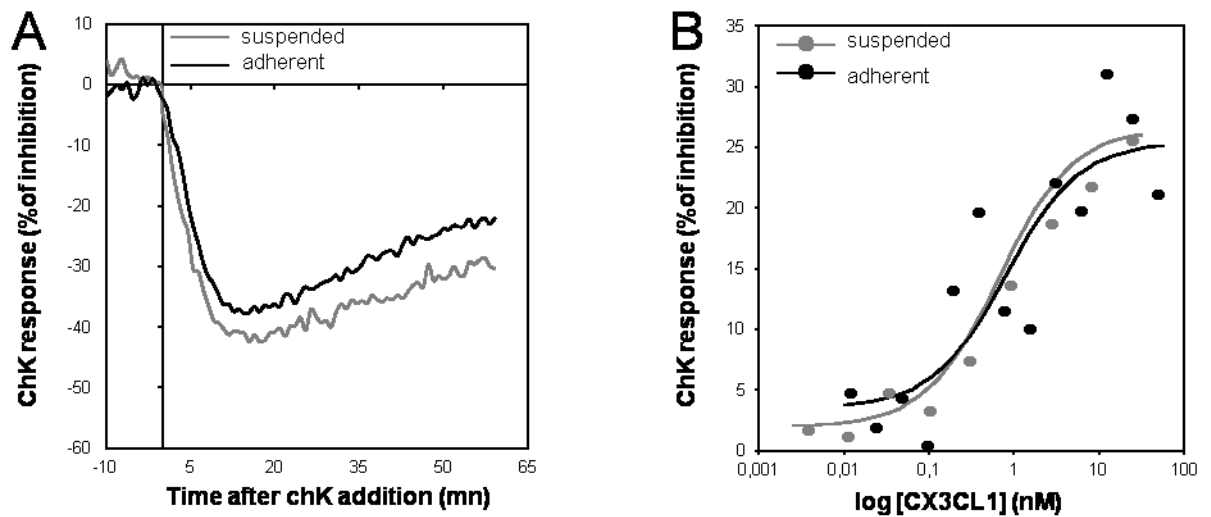


Figure S5. cAMP response induced by CX3CL1 in the HEK-gloCX3CR1 in the adherent state (black traces) and in the suspended state (grey traces).

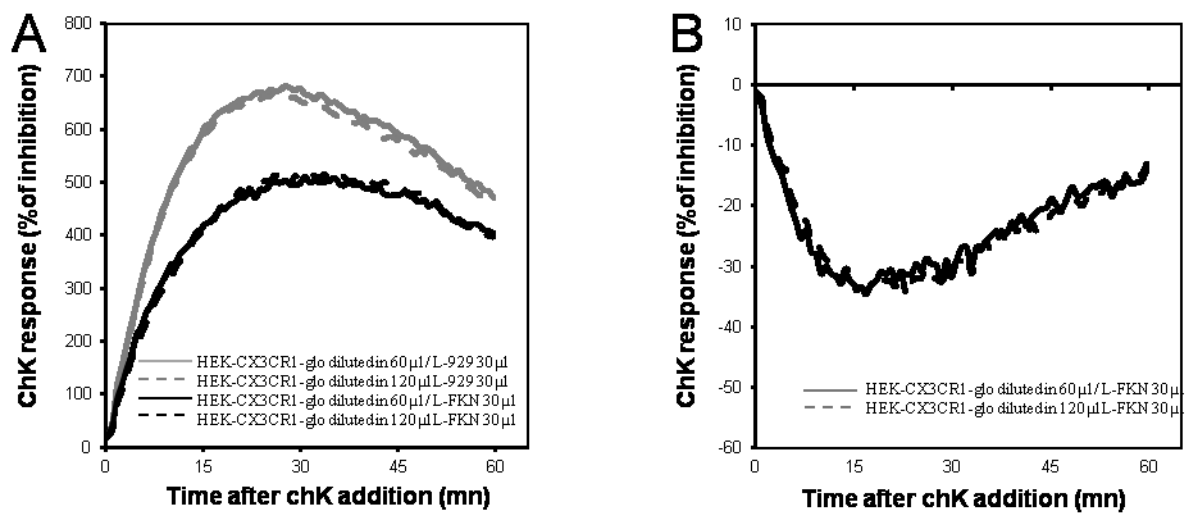


Figure S6. Effect of dilution on the response observed with membrane CX3CL1

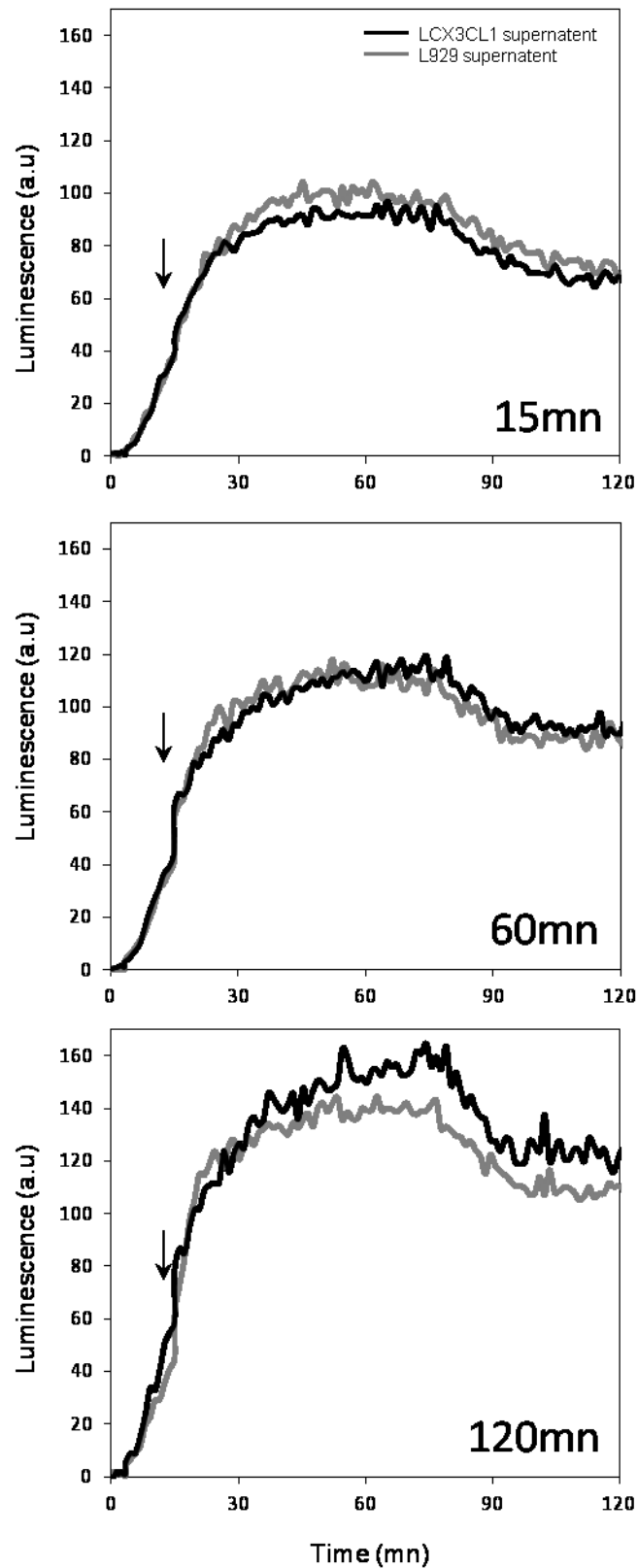


Figure S7. Responses observed in the HEK293 cells after addition of the supernatant of L929 (gray traces) L929-CX3CL1 (black traces) cells incubated 15 min (A), 60 min (B) or 120 min (C).

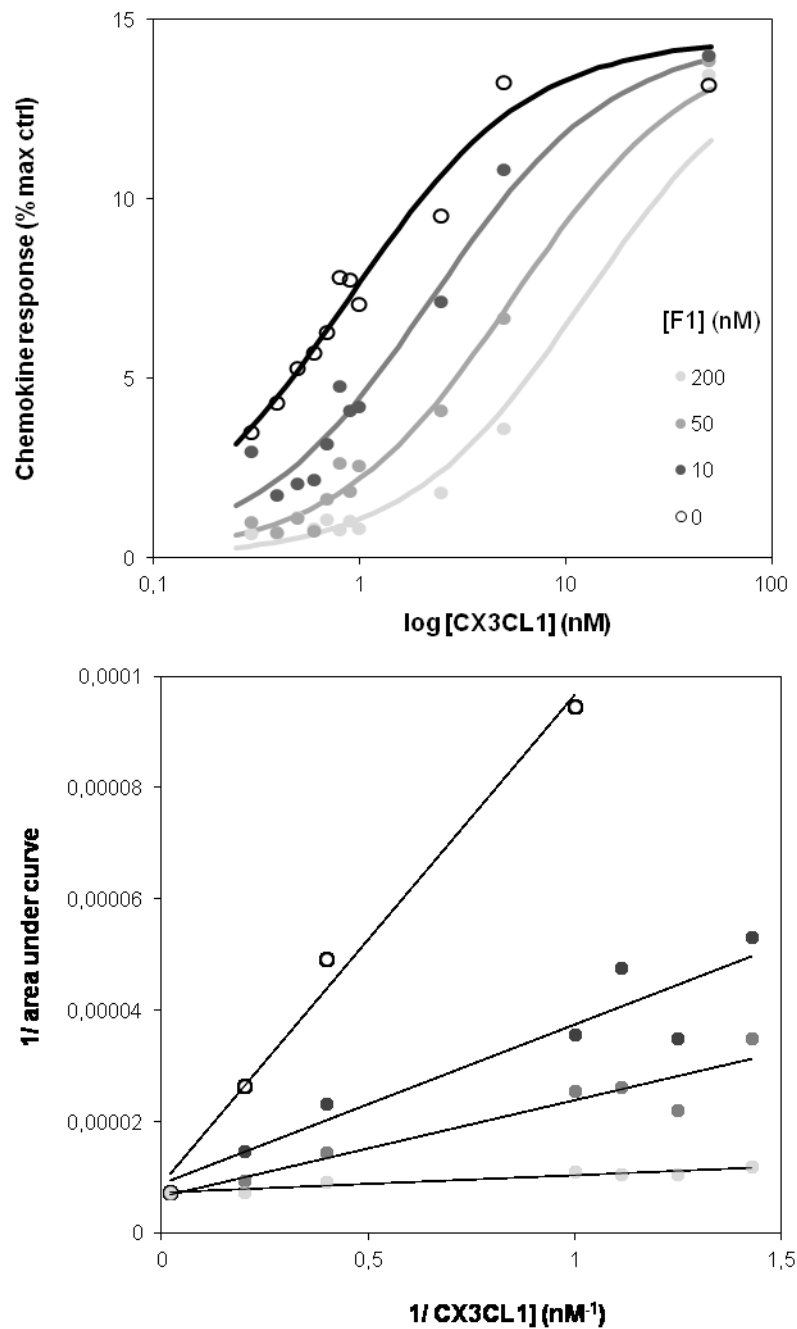


Figure S8. Competitive antagonism of the CX3CR1 antagonist F1 observed on the CX3CL1 cAMP-inhibitory responses

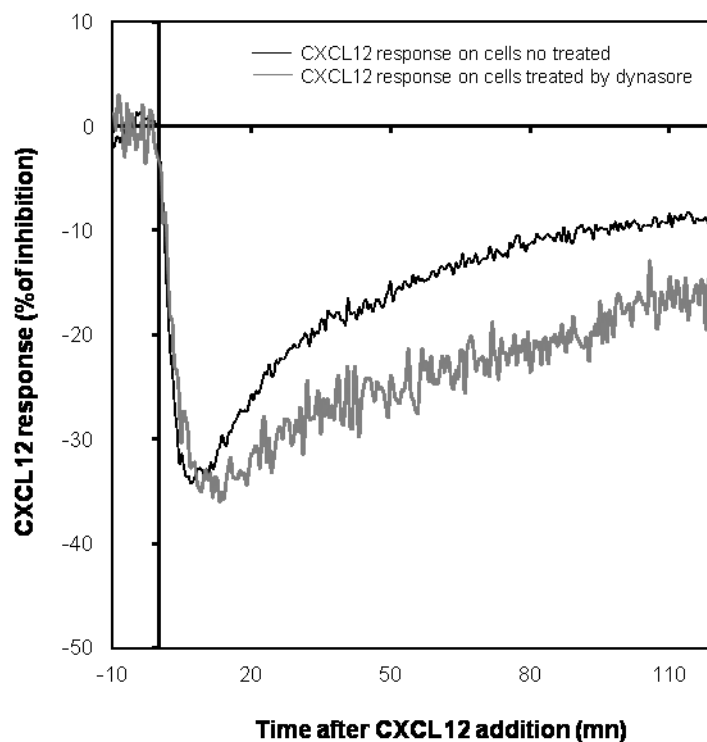
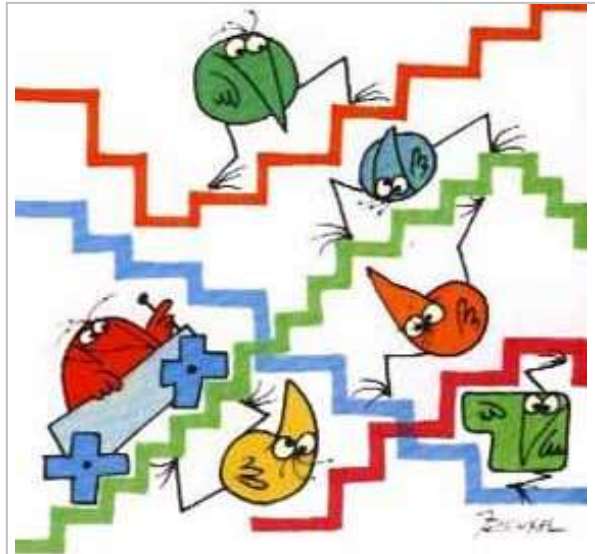


Figure S9. Effect of the treatment with dynasore on the cAMP-inhibitory responses observed with CXCL12 in the HEKglcX3CR1 clone cells.



AVEC UN ESCALIER PRÉVU
POUR LA MONTÉE ON REUSSIT
SOUVENT À MONTER PLUS BAS
QU'ON NE SERAIT DESCENDU AVEC UN
ESCALIER PRÉVU POUR LA DESCENTE.

Résultats Complémentaires

I. Caractérisation de la voie de signalisation AMPc en aval du CX3CR1 (*Compléments*)

Des expériences complémentaires à celles publiées dans l'article précédent ont été réalisées dans l'objectif d'explicitier les différents acteurs de la signalisation AMPc activée par CX3CL1.

A] Etude de l'implication de différents partenaires de la voie AMPc dans la réponse inhibitrice induite par les chimiokines

Les résultats des expériences exposées au cours de cette partie ont été obtenus grâce à la technologie GloSENSOR, décrite dans l'article et dont le protocole détaillé est repris sur la fiche technique 1 (Annexe). Les réponses chimiokinergiques présentées dans cette partie sont obtenues avec 50nM de chimiokine (sauf exception dans ce cas, la dose utilisée sera clairement indiquée). Cette concentration correspond à la quantité de chimiokine saturante, induisant une réponse AMPc inhibitrice dont l'amplitude est maximale.

A.1 – Réponse AMPc inhibitrice induite par le LPA

Parallèlement aux réponses chimiokinergiques, nous avons étudié la réponse AMPc inhibitrice induite par l'acide lysophosphatidique (LPA) dont le récepteur est exprimé de manière endogène à la surface des HEK293 (Ponsioen, Zhao et al. 2004). Ce récepteur est décrit comme un RCPG capable d'induire une multitude de signaux en fonction de son couplage avec différentes protéines G, dont une activation du signal calcique, une activation des Rho (Harvath, Robbins et al. 1991) ainsi qu'une modulation de l'activité AC.

La réponse LPA, enregistrée sur nos cellules HEKgloCX3CR1, se distingue des réponses chimiokinergiques, tant par son amplitude que par sa cinétique. En effet, l'addition de 5µM ou 50µM de LPA (Sigma Aldrich®), doses classiquement utilisées dans la littérature, génère une réponse dont l'amplitude maximale (10% d'inhibition) est nettement inférieure à la réponse AMPc inhibitrice engendrée en aval des RCK, (30-40% d'inhibition). De plus nous notons une différence de cinétique ; la réponse au LPA atteint son amplitude maximale vers 5 minutes après l'addition du ligand et se réalise en 30 minutes, c'est-à-dire beaucoup plus rapidement que les réponses chimiokinergiques qui se maintiennent au-delà d'une heure (**Figure V.1**). Cette différence de cinétique est encore valable même pour des réponses chimiokinergiques d'amplitude plus faible (obtenue avec 1nM de CX3CL1- Figure V-1 courbe

jaune). En effet, les faibles doses de chimiokine bien que générant des réponses dont l'amplitude maximale est comparable à celle obtenues avec le LPA, présentent des cinétiques plus lentes, particulièrement en ce qui concerne le retour à zéro.

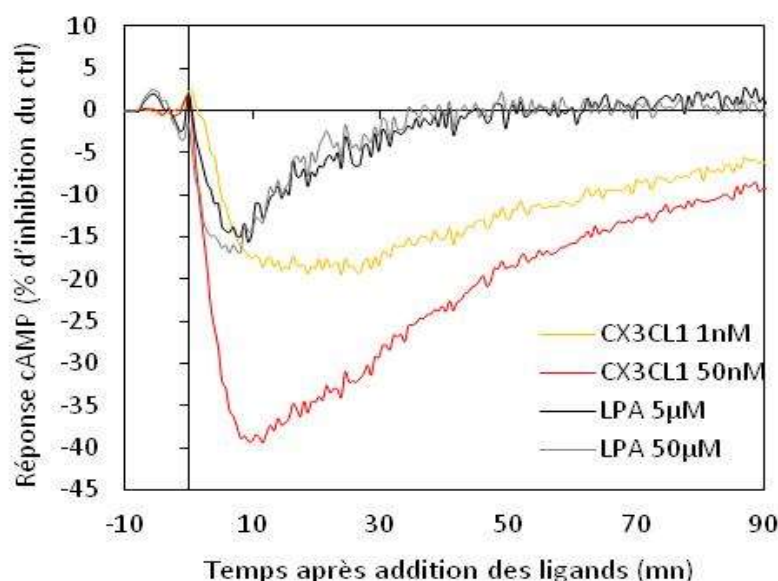


Figure V-1 : Comparaison de la réponse AMPc inhibitrice induite par une chimiokine, le CX3CL1 et une protéine non chimiokinergique, l'acide lysophosphatidique (LPA).

Réponses AMPc inhibitrices induites par le CX3CL1 (1nM – courbe jaune ou 50nM – courbe rouge) ou le LPA (5μM – courbe noire ou 50μM – courbe grise) mesurée sur des cellules HEKglcX3CR1 stimulées avec 1μM de FSK

A.2 – Effet du nombre de protéines G disponibles sur l'amplitude de la réponse AMPc inhibitrice

Les différentes expériences réalisées mettent en évidence une réponse AMPc inhibitrice dont l'amplitude correspond invariablement à environ 30-40% du signal mesuré en absence de CX3CL1. Cette valeur est indépendante de plusieurs paramètres de mesure, comme démontré dans l'article 1. La figure 6 de l'article compare l'amplitude de la réponse obtenue lorsque nous additionnons deux chimiokines (CX3CL1 et CXCL12) consécutivement ou simultanément. Nous observons que l'addition simultanée des deux chimiokines génère une réponse AMPc inhibitrice d'amplitude plus importante que celle obtenue par l'addition d'une seule chimiokine. Cependant l'amplitude de la réponse à cette double addition (~45% d'inhibition) n'est pas égale à la somme des réponses aux deux chimiokines additionnées individuellement (30% d'inhibition pour chaque chimiokine). Afin de déterminer si nous avons alors atteint le maximum d'inhibition possible, nous avons tenté une triple addition : les deux chimiokines, CX3CL1 et CXCL12, et le LPA, dont nous avons montré la capacité à induire une réponse AMPc inhibitrice (Figure V.1). Cette triple addition ne génère pas une réponse d'amplitude supérieure à la double addition (Figure V-2A et V-2B). Cette amplitude ne serait donc plus limitée par le nombre de récepteurs membranaires disponibles, mais plutôt un des éléments de la machinerie cellulaire, par exemple le nombre de protéines G disponibles. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à augmenter le

nombre de protéines G par transfection des différentes sous unités fonctionnelles: α_{i1} -GFP, β et γ .

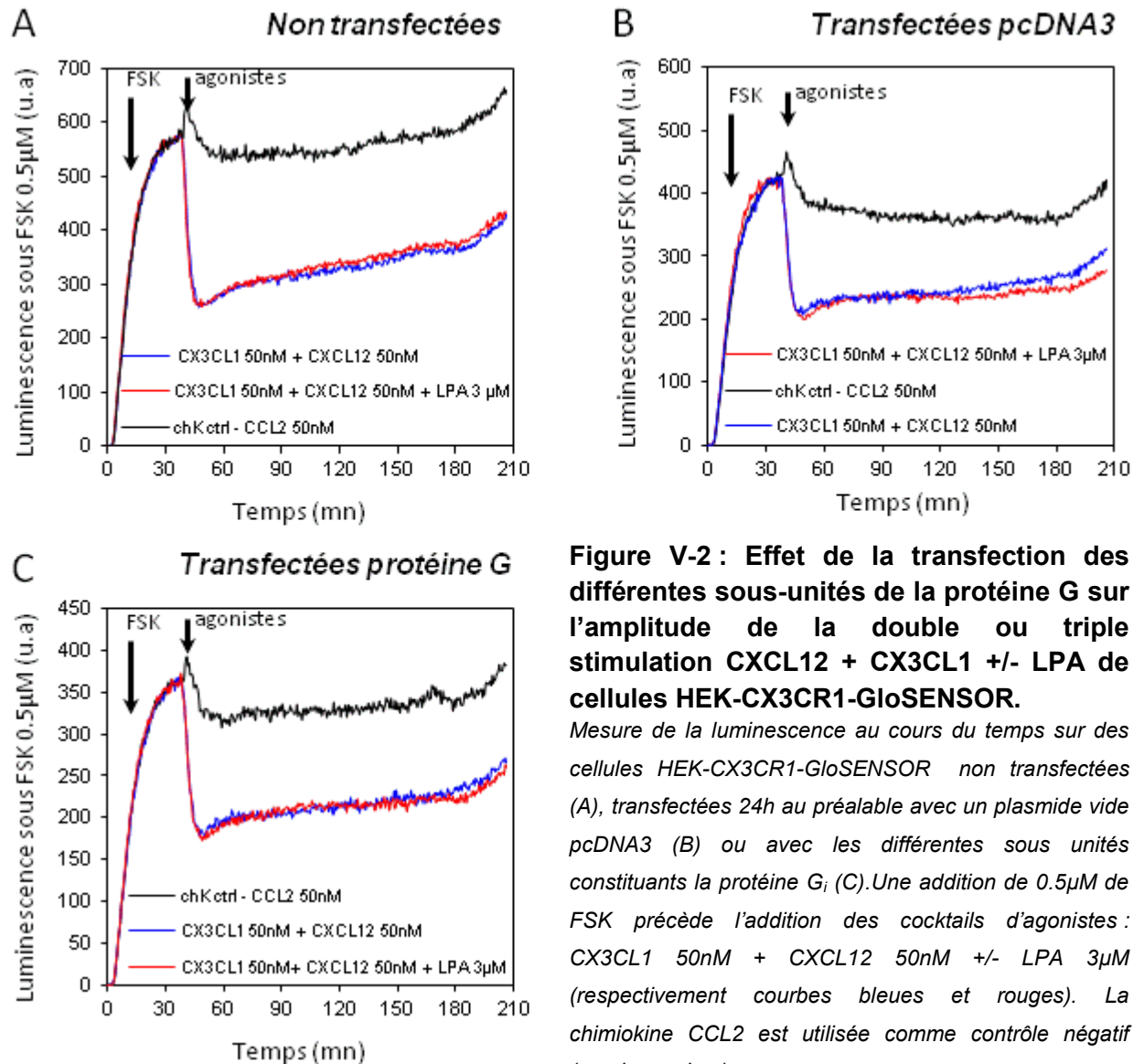


Figure V-2 : Effet de la transfection des différentes sous-unités de la protéine G sur l'amplitude de la double ou triple stimulation CXCL12 + CX3CL1 +/- LPA de cellules HEK-CX3CR1-GloSENSOR.

Mesure de la luminescence au cours du temps sur des cellules HEK-CX3CR1-GloSENSOR non transfectées (A), transfectées 24h au préalable avec un plasmide vide pcDNA3 (B) ou avec les différentes sous unités constituant la protéine G_i (C). Une addition de 0.5µM de FSK précède l'addition des cocktails d'agonistes : CX3CL1 50nM + CXCL12 50nM +/- LPA 3µM (respectivement courbes bleues et rouges). La chimiokine CCL2 est utilisée comme contrôle négatif (courbes noires)

La réponse induite par une triple addition (CX3CL1, CXCL12 et LPA à des concentrations saturantes) mesurée dans des cellules transfectées par les différentes sous unités de la protéine G n'est pas différente de celle observée dans les cellules contrôles (non transfectées ou transfectées avec le plasmide contrôle pcDNA3) (Figure V-2.C versus V-2.A & B). Toutefois ce résultat reste difficile à interpréter car seul le niveau de $G_{\alpha i}$ est vérifiable, du fait de la présence de l'étiquette YFP. Or nous ne pouvons affirmer que les cellules transfectées disposent d'un nombre de protéines G fonctionnelles supérieur aux cellules contrôles.

A.3 – Effet du complexe $\beta\gamma$

On sait que l'activation d'une protéine G libère non seulement une sous unité α_i active, mais également deux autres sous unités, formant une seule entité, à savoir le complexe $\beta\gamma$. Ce complexe peut réguler l'activité de certaines AC et contrôler la localisation de certaines PDE comme décrit dans les chapitres introductifs (cf. chapitre I §B.5.2).

Afin d'étudier l'éventualité d'une action de ce complexe, nous utilisons la gallein (Sigma Aldrich®), une protéine qui se fixe avec une forte affinité au complexe $\beta\gamma$ et l'empêche ainsi d'exercer ses différentes fonctions (Bonacci, Mathews et al. 2006). Une préincubation des cellules 30 minutes avec 30 μ M de gallein induit une diminution des signaux FSK et IBMX (Figure V-3A) comparés au niveau de luminescence atteint sur des cellules non traitées. Cette diminution est probablement due à une toxicité du traitement. Les réponses inhibitrices de l'AMPc induites par les chimiokines (CX3CL1 et CXCL12) (Figure V-3B→E) sont comparables à celles observées sur des cellules non traitées. Il semble donc que la réponse AMPc inhibitrice soit totalement liée à l'activation de la sous unité α_i de la protéine G et n'implique pas le complexe $\beta\gamma$.

A.4– Effet de la PKA

La PKA étant l'une des principales cibles de l'AMPc, son implication dans la forme de la réponse AMPc inhibitrice en aval du CX3CR1 n'est pas à exclure. En effet, il est probable que les PDE cellulaires participent au retour à zéro des réponses G_i comme cela est établi pour les réponses activatrices passant par G_s (Rich, Fagan et al. 2000). Il a par ailleurs été démontré que certaines de ces PDE, notamment la PDE4, présentes dans les HEK293 sont directement activées par la PKA (MacKenzie, Baillie et al. 2002).

Afin de tester l'effet de la PKA sur la cinétique de la réponse chimiokinergique, les cellules HEK_{glo}CX3CR1 sont traitées avec le H-89 (Sigma Aldrich®) ou le KT5720 (Tocris®), deux inhibiteurs commerciaux de la PKA. Le KT5720 est décrit comme plus spécifique que le H-89 (Murray 2008). Les cellules sont prétraitées durant 90 minutes avec 10 μ M de H-89 ou 1 μ M de KT5720.

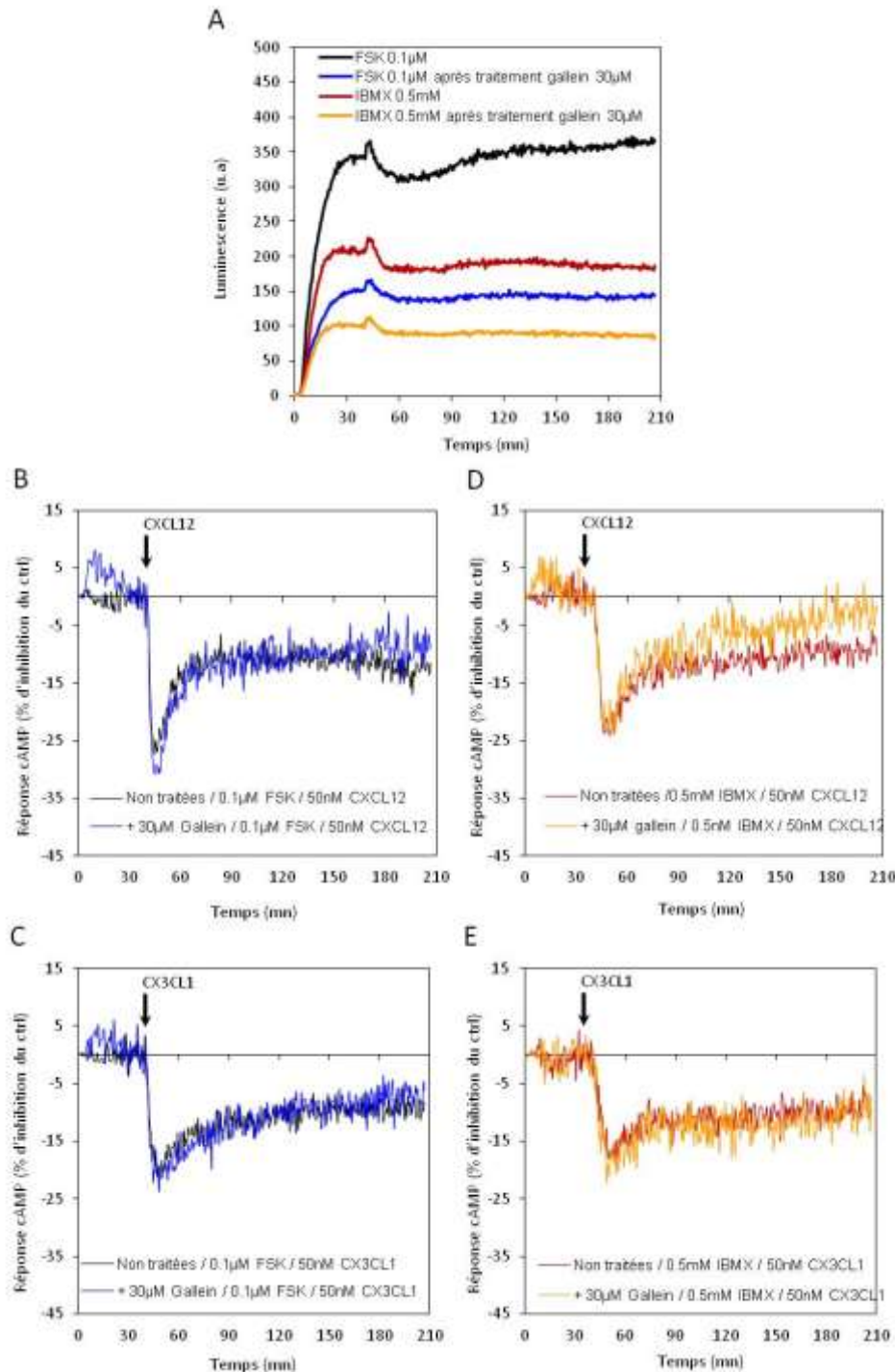


Figure V-3 : Effet du complexe $\beta\gamma$ sur les réponses G_i mesurées dans des HEK-CX3CR1-GloSENSOR.

A- Effet de la pré-incubation des cellules en présence de gallein (30 μM – courbe bleue et orange) sur la cinétique FSK (0.1 μM) ou l'IBMX (0.5 mM), comparé à celle observée sur cellules non traitées (respectivement courbe noire et courbe rouge).

B / C – Réponses cAMP inhibitrices, exprimées en pourcentage d'inhibition du contrôle (addition de CCL2) induite par le CXCL12 (50 nM) (B) ou le CX3CL1 soluble (50 nM) (C) après stimulation des cellules par 0.1 μM de FSK (courbes noires) en fonction du prétraitement des cellules avec 30 μM de gallein (courbes bleues)

D / E – Réponses cAMP inhibitrices, exprimées en pourcentage d'inhibition du contrôle (addition de CCL2) induite par le CXCL12 (50 nM) (B) ou le CX3CL1 soluble (50 nM) (C) après stimulation des cellules par 0.1 μM de FSK (courbes rouges) en fonction du prétraitement des cellules avec 30 μM de gallein (courbes oranges)

L'amplitude de la réponse FSK est nettement augmentée (+60%) par H-89 (Figure V-4A-*courbe rouge*) alors que le traitement au KT5720 (Figure V-4.A – *courbe grise*) ne semble pas affecter ce paramètre (Figure V-4A).

Les réponses chimiokineriques, CX3CL1 et CXCL12, exprimées en pourcentage du signal FSK contrôle, restent inchangées en présence des inhibiteurs de PKA, alors que la réponse au LPA est modifiée : sa durée est nettement augmentée. Cette modification de la cinétique de la réponse au LPA sous H-89, comme sous KT5720, impacte la cinétique de retour à zéro de la réponse. Le traitement n'affecte ni l'amplitude de la réponse ni le délai d'atteinte de cette réponse maximale après addition du LPA.

Ce résultat semble indiquer que les voies de signalisation induisant la diminution de l'AMPc intracellulaire en aval de deux familles de récepteurs – chimiokineriques et celui du LPA - sont différentes. La PKA semble induire un rétrocontrôle négatif sur la signalisation AMPc induite par le LPA. L'une des hypothèses envisageable, serait une phosphorylation à l'origine de la désensibilisation du récepteur au LPA. Cette boucle de régulation semble absente en aval des récepteurs de chimiokine pour ce qui est des réponses AMPc. Il n'est pas exclu qu'il d'une activation différentielles des effecteurs PKA et EPAC.

A.5 – Effet du MRP-4

Outre sa synthèse par les AC et sa dégradation par les PDE, le niveau d'AMPc intracellulaire est contrôlé par son extrusion cellulaire via les protéines d'efflux appelées « Multidrug-Resistance Protein » (MRP). Les MRP constituent une grande famille de protéines transmembranaires (faisant partie de la famille des transporteurs à cassette ATP) impliquées dans l'efflux de divers substrats hors des cellules. Certaines études avaient rapporté que l'AMPc pouvait sortir du cytosol vers le milieu extracellulaire via les MRP (Sampath, Adachi et al. 2002). Afin d'étudier le rôle de cette famille de protéines sur la réponse AMPc induite par les chimiokines (100nM), nous procédons à leur inhibition cette famille de transporteurs par le probénécide (Sigma Aldrich ®). La préincubation des cellules durant 90 minutes avec cet agent inhibiteur (100 ou 500µM) laisse le signal FSK (Figure V-5A) et les réponses chimiokineriques inchangés (Figure V-5B/C). Cette extrusion de l'AMPc ne semble donc pas impliquée dans le profil des signaux associés à l'AMPc cellulaire dans les HEK293.

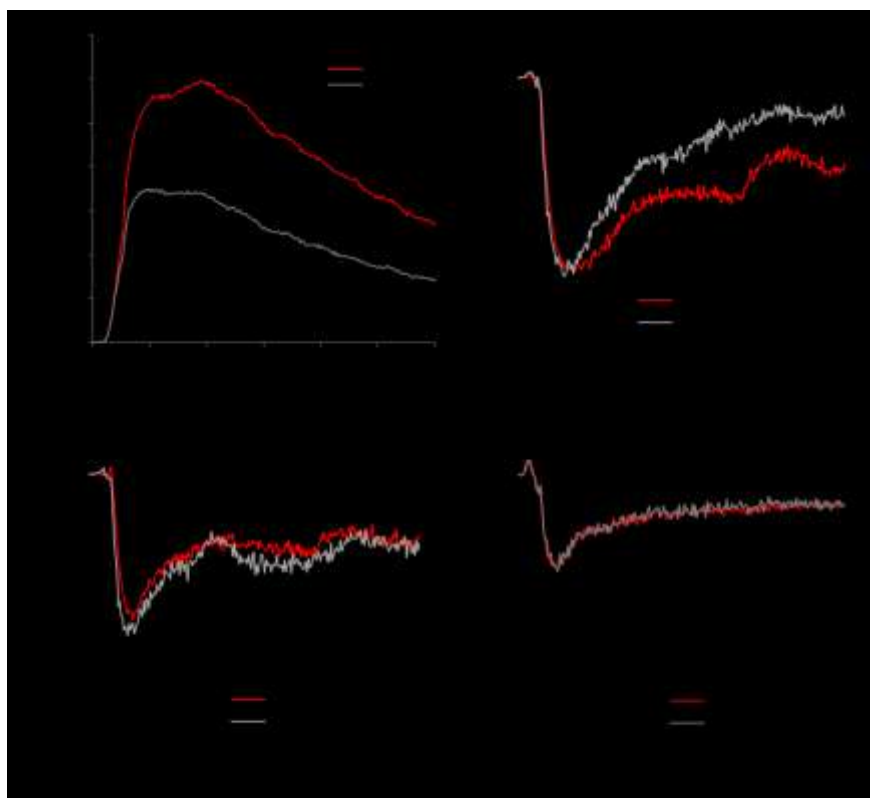


Figure V-4 : Effet de l'inhibition de la PKA sur la cinétique FSK et sur les réponses Gi mesurées dans des HEKglcX3CR1.

A. Effet des inhibiteurs H-89 (10μM courbe rouge) et KT5720 (1μM - courbe verte) sur la cinétique FSK (1μM - courbe grise) comparé à des cellules non traitées (courbe noire)

B/C/D - Réponses AMPc inhibitrice induite par l'addition de CX3CL1 (50nM) (B), CXCL12 (50nM) (C) ou de LPA (50μM) (D) en fonction du traitement H-89 (courbe rouge), KT5720 (courbe grise) ou non traitées (courbe noire).

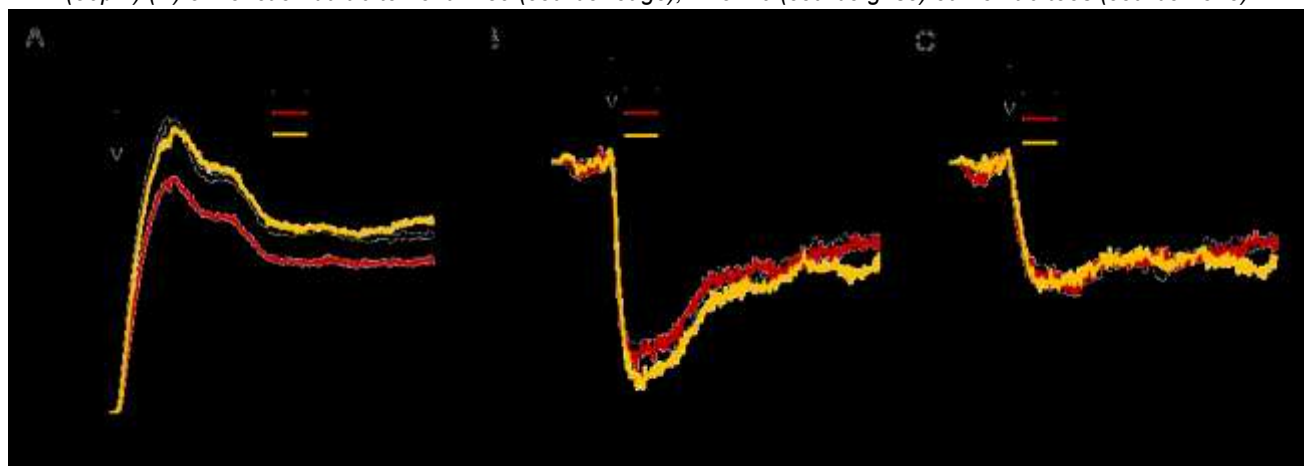


Figure V-5 : Effet de l'inhibition de MRP-4 par le probénécide sur la cinétique FSK et sur les réponses chimiokénergiques mesurées dans des HEKglcX3CR1.

A- Effet de la pré-incubation des cellules en présence de probénécide (100μM - courbe jaune ou 500μM - courbe rouge) sur la cinétique FSK (1μM), comparé à celle observée sur cellules non traitées (courbe noire).

B / C - Réponses cAMP inhibitrices induite par le CXCL12 (100nM) (B) ou le CX3CL1 soluble (100nM) (C) après stimulation des cellules par 1μM de FSK (courbes noires) en fonction de l'incubation avec le probénécide.

A.6 – Effet du calcium

Un traitement des cellules HEKglcX3CR1 avec du BAPTA, un chélateur de calcium, à hauteur de 10 μ M durant 30 minutes augmente l'amplitude des réponses AMPc inhibitrices étudiées. Cette observation est vraie aussi bien pour les réponses chimiokineriques (Figure V-6B) que pour la réponse au LPA (Figure V-6C). Cette différence ne semble pas imputable à une modification de l'activité AC car le traitement n'affecte pas le niveau de la réponse FSK (Figure V-6A). La signification de ce résultat sera discutée dans de la dernière partie du manuscrit : Discussion et perspectives.

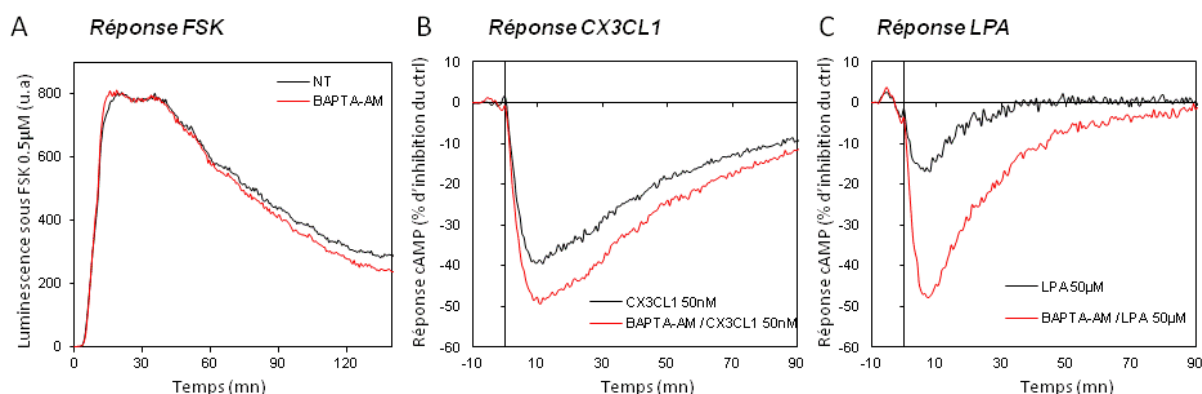


Figure V-6 : Effet du calcium sur la cinétique et l'amplitude de la réponse FSK et chimiokinerique.

A- Effet de la pré-incubation des cellules en présence de BAPTA-AM (10 μ M – courbe rouge) sur la cinétique FSK (1 μ M), comparé à celle observée sur cellules non traitées (courbe noire).

B / C – Réponses cAMP inhibitrices induites par 50nM de CX3CL1 soluble (B) ou 50 μ M de LPA (C) sur des cellules traitées au BAPTA (courbes rouges) ou contrôles (courbes noires) après stimulation des cellules par 0.5 μ M de FSK

A.7– Mesure d'une réponse AMPc induite par CX3CL1-immobilisé

Nous avons cherché à confirmer le résultat obtenu avec CX3CL1 membranaire (Article Figure 8) en utilisant un CX3CL1 « immobilisé », contenant le domaine chimiokine et le tronc mucine du CX3CL1 auquel est ajouté un « tag » 6xHistidine (CXC3L1-His). Cette forme du CX3CL1 peut être immobilisée au fond d'un puits grâce à un anticorps anti-Histidine (Fiche Technique 4), mimant ainsi la forme membranaire du CX3CL1. Mais à la différence de la forme membranaire, exprimée à la surface des cellules, la forme immobilisée présente l'avantage d'être plus « malléable ». On peut en effet contrôler et déterminer la quantité immobilisée au fond du puits, ce qui n'est pas aisé avec le CX3CL1 membranaire. Les tentatives d'obtention de

clones cellulaires exprimant des quantités de CX3CL1 différentes mais homogènes (clonale) sont restées infructueuses.

De manière comparable au CX3CL1 soluble, la forme immobilisée du ligand induit une réponse AMPc inhibitrice (Figure V-7A et 7B), qui est dose dépendante comme les réponses au CX3CL1 soluble, à cette différence près que nous n'atteignons pas la réponse maximale (Figure V-7C). Cette observation semble indiquer qu'avec plus de CX3CL1-His (quantité matériellement et « financièrement » irréalisable), il serait possible d'atteindre une réponse dont l'amplitude serait plus grande. Cela signifierait que la réponse à CX3CL1 immobilisé serait qualitativement plus efficace que la réponse à CX3CL1 soluble, comme cela sera détaillé dans la « Discussion » de ce manuscrit.

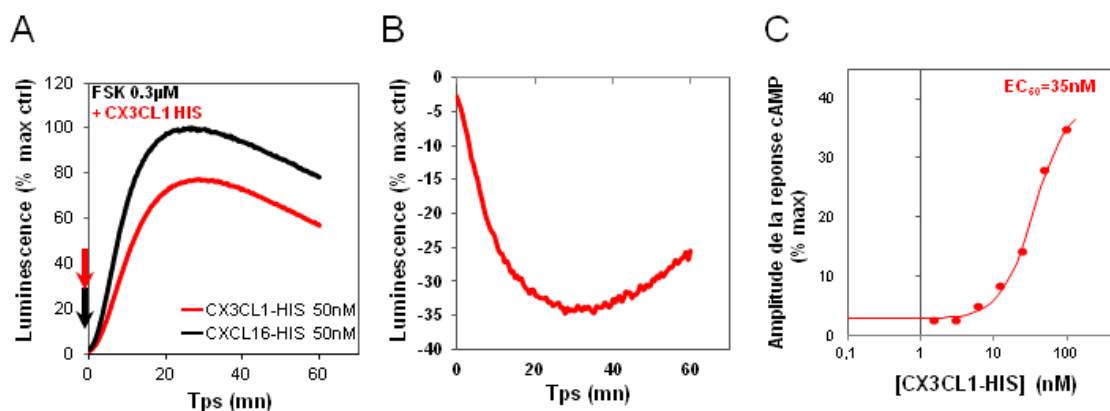


Figure V-7 : Réponse induite par le CX3CL1 « immobilisé ».

- A- Suivi de la luminescence au cours du temps émise par des HEKglcX3CR1 déposées dans des puits contenant 0.3µM de FSK et dans lesquels différentes chimiokine ont été immobilisée : 50nM de CX3CL1 (courbe rouge) ou CXCL16 (courbe noire). Le CXCL16 est utilisé comme chimiokine contrôle
- B- Réponses cAMP inhibitrices induite par le CX3CL1 immobilisé (50nM) (B) après stimulation des cellules par 0.3µM de FSK
- C- Courbe Dose réponse en fonction de la quantité de CX3CL1 immobilisé au fond du puits. .

B] Recrutement différentiel des β -arrestines en fonction de l'activation du récepteur par la forme soluble ou la forme membranaire du CX3CL1

Un des résultats importants de ce travail est l'observation d'une différence nette de cinétique entre les réponses inhibitrices obtenues avec les deux formes, soluble ou membranaire de CX3CL1. L'internalisation différentielle du récepteur (Article Figure 8 & 9) semble directement impliquée dans cette différence de réponse, selon les expériences utilisant le dynasore (Article Figure 8C). Nous avons cherché à étendre ce résultat en mesurant le recrutement des β -arrestines sur les récepteurs. Selon le schéma classique de transduction du signal par les RCPG (cf. Chapitre I), les β -arrestines sont impliquées dans l'arrêt du signal

transmis aux protéines-G et dans l'internalisation des RCPG ; elles devraient donc être recrutées par le CX3CL1 membranaire plus lentement que par le CX3CL1 soluble.

Le recrutement des β -arrestines au niveau du récepteur est visualisé grâce à la technique de BRET (**B**ioluminescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfert) CX3CR1-LUC / β -arrestine YFP, technique que j'ai eu à développer à mon arrivée au laboratoire. Cette technique dont le principe se rapproche de celui du FRET, à l'exception que le donneur est ici luminescent et non fluorescent, permet d'étudier les interactions protéine – protéine. Dans la technique de BRET, la première protéine ou donneur, ici le récepteur CX3CR1-VT, est fusionnée à la luciférase de Renilla d'où l'abréviation CX3CR1-LUC utilisée plus haut. La protéine fluorescente YFP est fusionnée à l'autre protéine d'intérêt ou accepteur : la β -arrestine en l'occurrence, susceptible d'interagir avec la première. A la suite d'une excitation de la luciférase à l'aide de son substrat, la Coelenterazine h (Interchim®), si les deux protéines sont suffisamment proches et correctement orientées, il y a un transfert d'énergie entre la luciférase et la YFP. Concrètement cela se traduit par une apparition d'un second signal émis à 530nm (longueur d'onde d'émission de la YFP) en plus du signal d'émission de la luciférase à 480nm (Figure V-8). S'il n'y a pas d'interaction, seule le signal d'émission de la luciférase est enregistré.

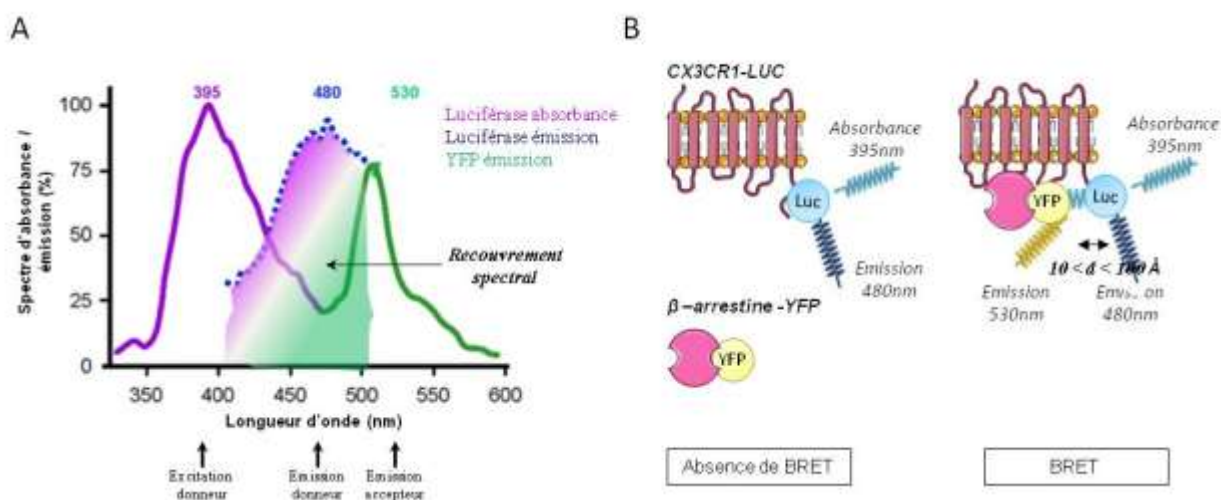


Figure V-8 : Principe de la technique de BRET.

A- Spectre d'excitation et d'émission de la luciférase et du YFP. Le BRET n'est possible que parce qu'il existe une zone de recouvrement spectrale entre les deux longueurs d'onde d'excitation.

B- Représentation schématique du BRET entre le récepteur CX3CR1-LUC et la β -arrestine YFP.

Le plasmide codant CX3CR1-LUC était déjà disponible au laboratoire alors que les plasmides codant les formes YFP des β -arrestine 1 et 2 ont été obtenues grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. Daniel FOURMY (Toulouse – INSERM U531). Ces plasmides ont été transfectés dans les cellules HEK293. Le lendemain de la transfection, nous procédons à la mesure de BRET au lecteur de plaque Berthold ® selon les détails techniques énoncés dans le fiche technique 2 fournie en annexe. Nous mesurons la luminescence en appliquant deux filtres

successifs à deux longueurs d'onde différentes, le premier à 485nm et le second à 530nm. Afin de générer une cinétique, ces mesures sont répétées toutes les 30 secondes environ sur un créneau d'une à deux heures. Des cellules transfectées uniquement avec le plasmide codant le récepteur sont utilisées pour déterminer le bruit de fond lors des calculs des ratios BRET. Afin de comparer le recrutement différentiel des β -arrestines au niveau du récepteur CX3CR1-LUC, en fonction de la forme du CX3CL1, les cellules transfectées sont déposées soit dans des puits contenant 25nM de CX3CL1 soluble, soit dans lesquels du 100nM de CX3CL1-HIS ont été immobilisés.

Les expériences de BRET, présentées sur la figure V-9, mettent en évidence une différence de la cinétique de recrutement des β -arrestines, ici β -arrestine 2, selon que les cellules sont déposées sur du CX3CL1 soluble ou sur du CX3CL1 immobilisé: la seconde est plus lente (maximum à atteint entre 20 et 25 minutes contre moins d'une minutes sous CX3CL1 soluble). Cette donnée, qui reste à confirmer, semble montrer que la réponse au CX3CL1 immobilisé (et probablement au CX3CL1 membranaire) est qualitativement différente de celle à CX3CL1 soluble. Toutefois, il y a un décalage net entre la cinétique du signal BRET et celle du signal AMPc étudié par la technique GloSENSOR® (réponse au CX3CL1 maximale atteinte au bout de 8 minutes). Ce qui signifierait que la réponse AMPc se réalise malgré le recrutement des β arrestines au niveau de la région C-terminale du récepteur. Cette donnée contraste avec le modèle classique de la signalisation des RCPG, dans lequel le recrutement des β -arrestines « stoppe » le signal Gi.

Nous avons tenté d'étudier l'effet des β -arrestines sur la réponse AMPc en diminuant leur concentration cellulaire par la technique de siRNA (Hunton, Barnes et al. 2005; Shenoy, Drake et al. 2006). Mais aucun des deux couples différents de siRNA proposés pour les arrestines ne s'est avéré efficace sur l'expression de celles-ci dans notre clone HEKgloCX3CR1.

C] Visualisation de la réponse AMPc inhibitrice en imagerie avec la sonde FRET : T-EPAC-vv

Afin d'étudier une réponse AMPc au sein d'une cellule unique, nous avons eu recours à la sonde FRET, T-EPAC-vv (Klarenbeek, Goedhart et al. 2011) que nous avons transfectée dans un clone HEK293 exprimant de manière stable le récepteur CX3CR1 (Daoudi, Lavergne et al. 2004). Les cellules sont stimulées avec 10 μ M de FSK avant l'addition de 50nM de CX3CL1. Le signal CFP et YFP sont enregistrés au cours du temps (Microscope Zeiss-Observer Z1 / Caméra Hamamatsu C11440). Le signal FRET représente le ratio du signal du donneur (CFP) sur celui de l'accepteur (YFP). La réponse FSK (flèche noire) induit une montée du signal dans

toutes les cellules du champ comme le présente la moyenne des mesures par champ (courbe en gras) (Figure V-10 A). Cependant la réponse à CX3CL1 (flèche rouge) n'est appréciable que sur certaines cellules (Figure V-10 B). On peut distinguer deux groupes de cellule, ici en fonction de l'amplitude de la réponse AMPc inhibitrice ; supérieure à 10% du contrôle de ou inférieure à 10%. Les premières seront considérées comme des « répondeuses ». La moyenne des réponses de ces cellules est rapportée en noir. La moyenne des cellules « non répondeuses » est rapportée en bleu (Figure V-10 B). La cinétique de la réponse observée dans des cellules uniques par cette technique est comparable à celle observée sur une population cellulaire avec la technique GloSensor.

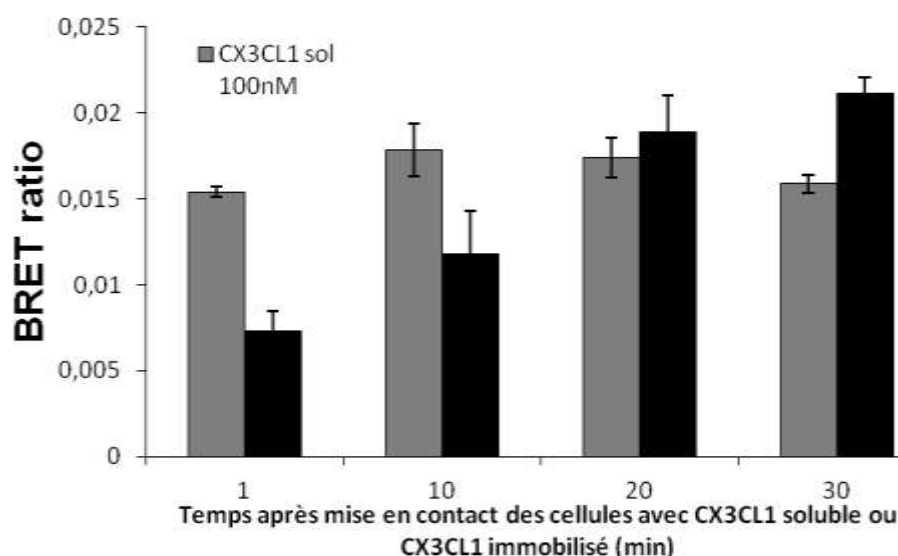


Figure V-9 : Etude du recrutement des β -arrestines par BRET.

Expression du ratio BRET (Emission accepteur / Emission donneur) au cours du temps en fonction que les cellules transfectées avec les plasmides CX3CR1LUC et β -arrestine2 soient déposées dans des puits contenant soit le CX3CL1 soluble (barres grises) ou du CX3CL1- HIS, forme artificiellement immobilisée (barres noires).

II. Implication de l'AMPc dans les fonctions associées au couple CX3CL1/CX3CR1

L'AMPc est le premier messager à avoir été étudié en aval des protéines Gi, puisque c'est de leur fonction inhibitrice sur l'AC qu'elles tirent leur nom. Cependant son rôle dans les fonctions chimiokinerigues reste controversé. Il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de l'AMPc sur les deux fonctions principales du couple CX3CL1/CX3CR1 - le chimiotactisme et l'adhésion - afin de la corrélérer avec les réponses inhibitrices d'AMPc observées en aval du CX3CR1. En effet ces deux fonctions sont généralement étudiées in vitro avec des cellules

(lignées cellulaires ou cellules primaires) à un état basal : nous les étudions ici après un traitement qui augmente l'AMPc cellulaire, condition souvent rencontrée dans l'environnement inflammatoire où sont les cellules immunes en situation de réponse chimiokinergique.

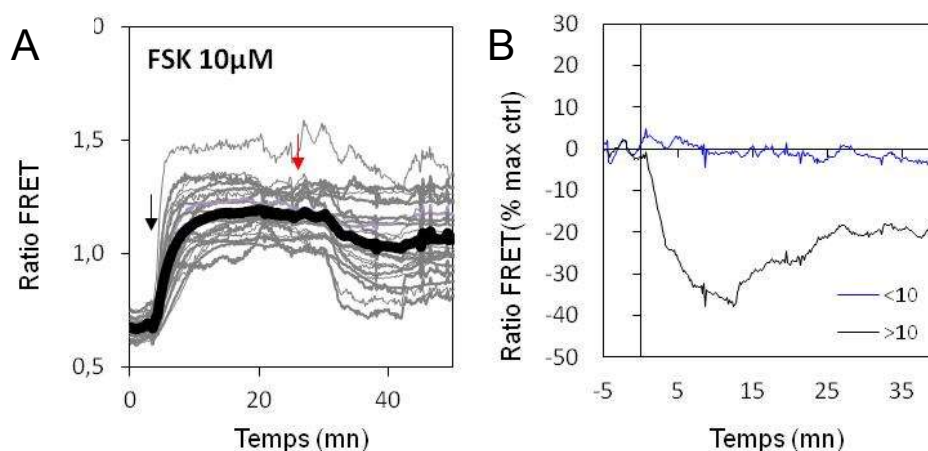


Figure V-10 : Etude de la réponse AMPc induite par le CX3CL1 par FRET

A - FRET brut mesuré sur HEK-CX3CR1 transfectées avec la sonde T-EPAC-vv. Les cellules sont activées avec 10 µM de FSK (flèche noire) avant l'addition de 50 nM de CX3CL1 (flèche rouge). Les mesures des cellules individuelles sont en gris, la moyenne des mesures faites est en noir gras

B - Réponses AMPc moyennes induites par le CX3CL1 (50 nM) rapportées en % du signal contrôle avant l'ajout de CX3CL1. Deux classes de cellules sont distinguées en fonction de l'amplitude de leurs réponses, les « répondeuses » (moyenne en noir) dont la réponse est supérieure à 10% d'inhibition du signal FSK initial et les « non répondeuses » dont la réponse est inférieure à 10% (moyenne en bleu). Il y a 20 cellules « répondeuses » et 6 « non répondeuses ».

A] Chimiotactisme et AMPc

Afin de tester l'effet de l'augmentation d'AMPc intracellulaire sur la migration des cellules CX3CR1⁺ en réponse au chimiotactisme induit par CX3CL1, nous avons utilisé une chambre de migration commercialisée par Transwell®. Il s'agit d'un système de plaque 24 puits sur lesquels sont placés des supports amovibles dont le fond est une fine membrane en Polycarbonate (Fiche Technique 6). Cette membrane peut être traversée par les cellules qui sont déposées par-dessus en réponse à l'agent chimio-attractant, ici 5 nM de CX3CL1 ou 5 nM de CCL2, déposé lui au fond du puits.

Nous observons que l'augmentation d'AMPc intracellulaire au sein des cellules CX3CR1⁺ induite par de la FSK (30, 15 ou 5 µM) ou de l'IBMX (0.5 mM) provoque une diminution significative du chimiotactisme dépendant de CX3CL1 (Figure VI-1).

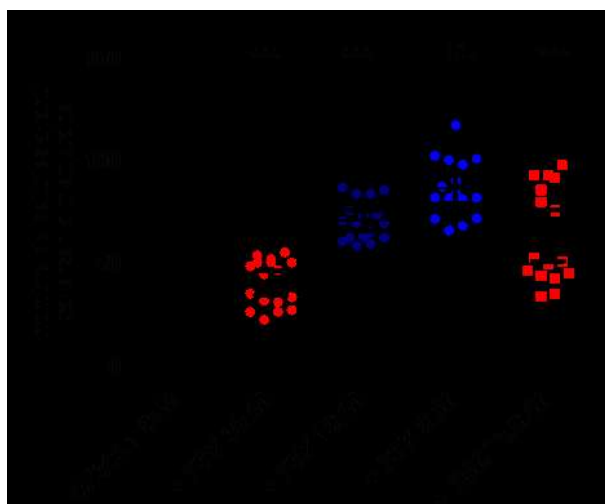


Figure VI-1 : Effet de la FSK et de l'IBMX sur le chimiotactisme CX3CL1 dépendant.

150 000 CHO-CX3CR1 VT sont incubées 20 minutes avec différentes concentrations de FSK (30, 15 ou 5 μ M) ou d'IBMX (0.5mM). Le groupe témoin ne subit aucun traitement. La réponse migratoire en réponse à 5nM de CX3CL1 est analysée grâce à la technologie Transwell®. Test statistique Dunnett's Multiple comparison ; $p < 0.05$

B] Effet de l'augmentation d'AMPc intracellulaire sur la fonction adhésive du couple CX3CR1/CX3CL1

Nous avons utilisé ici la technique d'adhésion sous flux ou adhésion dynamique, optimisée au laboratoire (Fiche Technique 5), qui consiste à quantifier l'adhésion sur CX3CL1 immobilisé de cellules CX3CR1⁺ (CHO-CX3CR1 ou U-937, lignée monocyttaire CX3CR1⁺) soumise à un flux (20ml/hr - 0.55 dynes) mimant ainsi la circulation sanguine. L'immobilisation du CX3CL1 sur le fond de la cellule d'adhérence est réalisée comme précédemment grâce à la pré-immobilisation d'un anticorps anti-His (Fiche Technique 4). Nous comparons l'adhésion sur CX3CL1-His de cellules CX3CR1⁺ prétraitées ou non à la FSK, 5 ou 25 minutes avant injection dans le circuit. Nous observons que les CHO-CX3CR1 (Figure VI-2A) comme les U-937 (Figure VI-2B) adhèrent moins sur CX3CL1 après un traitement à la FSK. Cette diminution de l'adhérence est fonction de la dose de FSK utilisée. L'utilisation d'autres agents augmentant l'AMPc intracellulaire, comme l'IBMX, le dibutyryl-AMPc ou encore des agonistes de RCPG couplés à Gs tel que l'isoproterenol ou la prostaglandine E2, induit aussi une diminution semblable (Figure VI-2C).

Parallèlement, nous avons étudié l'impact de l'AMPc sur l'adhésion cellulaire passant par les intégrines et la fibronectine. Dans la littérature, plusieurs données contradictoires existent. L'adhésion sur fibronectine est affectée tantôt positivement, tantôt négativement. Nous n'observons ici aucun effet significatif de la FSK sur cette adhérence (Figure VI-2D).

Nous avons ensuite entrepris une série d'expériences visant à déterminer les différents intermédiaires moléculaires de cet effet. Nous avons ainsi traité nos cellules avec un inhibiteur de la PKA, le H-89 (10 μ M – 1H) avant de les soumettre à la FSK. Aucune différence significative n'est observée que les cellules soient traitées ou non avec le H-89 (Figure VII-2E). Nous avons aussi cherché un éventuel lien entre cette adhérence sensible à l'AMPc et la réponse passant par Gi qui diminue l'AMPc cellulaire. Aussi avons-nous prétraité les cellules CX3CR1⁺ avec la

PTX. Les résultats ne montrent aucun effet de la PTX sur la diminution de l'adhésion FSK dépendante (Figure VI-2F).

Nous concluons que l'AMPc induit bien un effet sur l'adhésion CX3CR1-CX3CL1 des cellules utilisées sans pour autant modifier leur adhérence cellulaire globale passant par les intégrines. Mais nous n'avons pas réussi à expliciter le mécanisme à l'origine de cet effet.

C] AMPc et Survie

La mort cellulaire est un des paramètres pouvant expliquer la décroissance du signal FSK et IBMX au cours du temps (Article Figure 4). Afin de tester cette hypothèse nous réalisons un test d'apoptose après addition de FSK ou d'IBMX, puis de chimiokine. Le CCL2 est utilisé comme molécule contrôle. Les cellules sont récupérées au bout de 3h d'incubation et marquées avec un agent intercalant de l'ADN, l'iodure de propidium (PI) et analysées par cytométrie en flux pour déterminer la proportion de cellules en apoptose ayant intégré le PI.

Nous observons une mort cellulaire proportionnelle à la concentration de FSK et d'IBMX : l'augmentation de l'AMPc induit la mort cellulaire. Cette mort cellulaire est largement inhibée dans les puits où le CX3CL1 a été additionné.

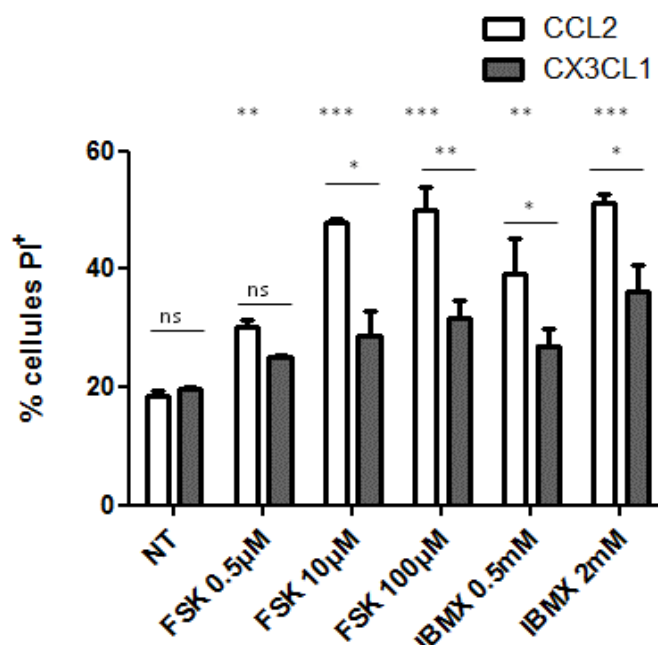


Figure VI-3 : Effet du CX3CL1 sur la mort cellulaire

Quantification de la proportion de cellules PI⁺ par rapport au nombre total de cellule en fonction d'un traitement FSK (0.5, 10 ou 100µM) ou IBMX (0.5 ou 2mM) suivie d'une addition 15 minutes plus tard de 50nM de CCL2 (barres blanches) ou CX3CL1 (barres grises).

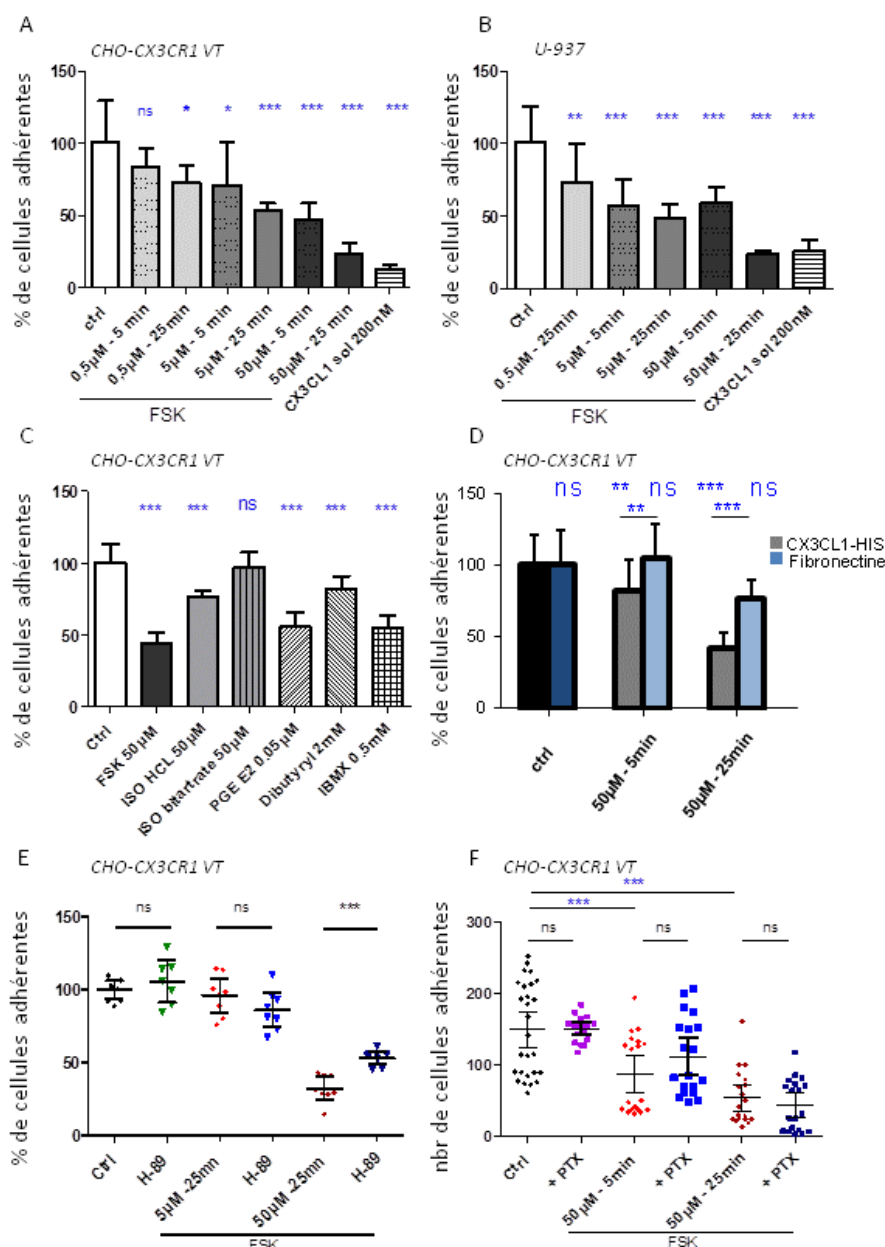


Figure VI-2 : Etude de l'effet d'une augmentation de l'AMPc intracellulaire sur la fonction adhésive du couple CX3CL1-CX3CR1

A / B- Effet de l'augmentation d'AMPc intracellulaire induite par l'incubation (5 ou 25min) de CHO-CX3CR1 (A) ou de U-937 (B) en présence de différentes concentrations de FSK (5 ou 50µM) sur l'adhésion de ces cellules sur 100nM de CX3CL1-HIS. Test statistique Dunnett's Multiple Comparison ; $p < 0.05$

C- Effet de l'augmentation d'AMPc intracellulaire induite par diverses molécules (isoproterenol - ISO, prostaglandine - PGE E2, dibutyryl, IBMX ou forskoline - FSK) sur l'adhésion de CHO-CX3CR1 sur 100nM de CX3CL1-HIS. Test statistique Dunnett's Multiple Comparison ; $p < 0.05$

D- - Effet de l'augmentation d'AMPc intracellulaire induite par l'incubation (5 ou 25min) de CHO-CX3CR1 avec 50µM de FSK sur l'adhésion sur fibronectine (2µg/ml) ou CX3CL1-HIS (100nM) Test statistique : t test ; $p < 0.0001$

E- Effet d'un traitement préalable des cellules (CHO-CX3CR1) avec un inhibiteur de la PKA, le H-89 (100µM - 1h) sur l'adhésion de ces cellules sur CX3CL1-His après traitement FSK. Test statistique : t test ; $p < 0.0001$

F- Effet d'un traitement préalable des cellules (CHO-CX3CR1) avec la PTX (100ng/ml - 12h) sur l'adhésion de ces cellules sur CX3CL1-His après traitement FSK Test statistique : t test ; $p < 0.0001$



Discussion & Perspectives

Discussion et perspectives.

Les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans une multitude de processus physiologiques et physiopathologiques. L'étude des signaux cellulaires induits par les chimiokines est entreprise depuis longtemps, en particulier pour tester de possibles molécules « médicaments ». Cependant la quantification en temps réel et dans des cellules vivantes des signaux chimiokinergiques reste confinée à la seule mesure de calcium. L'existence d'une voie de signalisation AMPc en aval des RCK est admise mais sa cinétique n'a jamais été explicitée. Aussi nous avons entrepris de mesurer en temps réel les réponses AMPc inhibitrice en aval des RCK à l'aide des nouveaux outils technologiques, déjà utilisé en routine pour la mesure de réponse AMPc stimulatrice (§ 1.1). Nous avons ainsi mis en évidence une conservation remarquable de la cinétique des réponses aux chimiokines solubles et à CX3CL1 en particulier (§ 1.2) et observé pour la première fois une réponse qualitativement différente en aval du récepteur activé par le CX3CL1 membranaire comparé à celle obtenue avec la forme soluble (§ 1.3). De façon surprenante, dans ces réponses, les PDE ne semblent jouer qu'un rôle secondaire (§ 1.4). Enfin, nous avons tenté d'explicitier le rôle de cette réponse AMPc inhibitrice dans les fonctions chimiotactiques et adhésives du couple CX3CL1/CX3CR1 (§ 1.5) ainsi que sur son action sur la mort cellulaire (§ 1.6).

1.1. Optimisation d'une méthode de mesure en temps réel de l'AMPc

Comparaison des résultats obtenus avec les deux sondes

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à optimiser l'utilisation d'une sonde luminescente sensible à l'AMPc, le biocapteur Glosensor commercialisé par Promega®, pour la mesure d'une réponse inhibitrice. Parallèlement, nous avons utilisé la sonde FRET, à savoir T-Epac-vv (Klarenbeek, Goedhart et al. 2011), qui permet une étude par imagerie et une mesure unicellulaire contrairement à la technique Glosensor qui permet la mesure d'une réponse globale, moyennant la réponse sur des centaines de cellules, mesurée en lecteur de plaque. Malgré quelques succès avec la sonde FRET, les difficultés rencontrées (*efficacité aléatoire des transfections transitoires, étroitesse des concentrations FSK sous lesquelles la réponse G_i est observable*) n'ont pas permis son utilisation extensivement.

La comparaison des signaux mesurés par les deux techniques révèle un point de divergence majeur portant sur la cinétique de la réponse FSK. En effet, alors que la réponse FSK maximale est atteinte en 5 minutes avec la sonde FRET (Article - Figure 1), il faut attendre

au moins 20 minutes avec le sonde luminescente. Toutefois, des réponses chimiokinergiques d'amplitude et de cinétique très semblables ont pu être observées avec les deux types de sonde.

La différence de cinétique de la réponse FSK amène une première question sur la manière avec laquelle la sonde luminescente reflète les changements de niveau d'AMPc cellulaire et surtout avec quel délai

Domaine de linéarité de la sonde luminescente

L'utilisation d'un analogue perméant et non hydrolysable de l'AMPc, le 8-br-cAMP, apporte quelques éléments de réponse à la première question ([Article - Figure S3](#)) : le signal donné par la sonde luminescente est proportionnel à la concentration d'AMPc quand celle-ci n'excède pas 1 μ M.

Réactivité de la sonde luminescente

L'existence d'un délai entre la variation de l'AMPc cellulaire donnée et celle du signal luminescent émis, dépend des constantes d'association et de dissociation entre l'AMPc et la sonde. Il est possible, en principe, de déterminer la constante d'association d'un biocapteur en mesurant le signal conséquent à une libération instantanée d'AMPc, par exemple avec un AMPc « cagé ». Par contre, il est plus difficile de connaître la constante de dissociation de la sonde. Or c'est ce dernier paramètre qui est crucial dans la mesure d'une réponse inhibitrice. Nous disposons toutefois d'un indice, fournit par l'utilisation de F1, l'antagoniste compétitif de la chimiokine CX3CL1 ([Article - Figure S9](#)). En effet, nous avons observé que le temps de retour de la réponse AMPc induite par CX3CL1, sous l'effet de F1, est comparable au temps que met la réponse CX3CL1 elle-même à atteindre son maximum ([Article - Figure 8A](#)). Cette observation indique qu'il existe bien un temps de latence (*ou temps de réactivité de la sonde*) important entre le changement effectif de la concentration cellulaire d'AMPc et le signal émis par la sonde GloSensor.

Un second paramètre important pour la réactivité de la sonde aux variations- en particulier négatives – de l'AMPc cellulaire est le « turnover » de l'AMPc, c'est-à-dire sa vitesse de synthèse et de dégradation au sein de la cellule ; plus ce « turnover » sera rapide et plus la réactivité du biocapteur aux changements (*augmentation ou diminution*) de la concentration de l'AMPc sera rapide. Ce paramètre est ralenti par exemple par l'utilisation d'inhibiteurs de PDE. C'est d'ailleurs ainsi que nous expliquons le fait que la réponse chimiokinergique présente une cinétique plus lente en présence d'IBMX ([Article - Figure 4](#)).

Insensibilité des sondes utilisées aux compartimentations subcellulaires

Les deux sondes utilisées au cours de cette étude sont cytosoliques, de ce fait elles ne reflètent que la moyenne des changements de la concentration d'AMPc au sein de la cellule. Autrement dit, elles sont insensibles à la compartimentation du signal AMPc. Or il semble aujourd'hui impossible de considérer les signaux AMPc en négligeant ce paramètre. Aussi l'une des perspectives de ce travail serait l'utilisation en imagerie d'une sonde FRET de nouvelle génération, qui permet un adressage de la sonde au niveau sous-membranaire ou à tout autre compartiment cellulaire en fonction du peptide d'ancrage fusionné (Agarwal, Yang et al. 2014). Cela permettrait d'étudier la compartimentation des réponses AMPc inhibitrices induite par les chimiokines.

Malgré cette limitation, la technique de sonde lumineuse lue par lecteur de plaque présente des avantages considérables pour cribler rapidement les différents agents pharmacologiques développés au sein de notre laboratoire et ainsi sélectionner les meilleurs candidats à tester *in vivo* dans nos modèles souris, comme j'ai pu le faire au cours de ma thèse (*travaux couverts par la confidentialité de brevets en cours*).

1.2. Invariance de la cinétique de la réponse chimiokinergique. Rôle de l'internalisation du RCK

L'utilisation de la sonde lumineuse nous a permis de visualiser une réponse AMPc inhibitrice en aval des RCK (*CX3CR1*, *CXCR4*, *CCR2* et *CXCR6*) qui, exprimée en pourcentage du niveau contrôle avant addition du ligand, apparaît remarquablement stable. Sa cinétique ne montre aucune variation notable selon :

- la nature de la molécule utilisée pour augmenter le niveau d'AMPc (*forskoline*, *prostaglandine E2*, *isoprotérenol*) (Article – Figure 1)
- la concentration de FSK (tant qu'elle reste inférieure à 1µM) (Article – Figure 3)
- le temps écoulé entre l'addition de la FSK et celle de la chimiokine (*simultanée*, 5, 10, 20, 60 minutes après la FSK, 5 minutes avant la FSK) (Article – Figure 2)
- le RCK étudié (qu'il soit exprimé de manière endogène comme le CXCR4, ou de manière exogène comme le CX3CR1, CCR2 ou le CXCR6) (Article – Figure 5)
- l'activation ou non au préalable d'un autre RCK (Article – Figure 6)
- le type cellulaire (HEK293, K562, Jurkat, U937, HBP-all) (Article – Figure S5)
- la sonde utilisée (Résultats complémentaires– Figure V.10)

Rôle du calcium intracellulaire

Les seules variations d'amplitude et de cinétique de la réponse chimiokinergique ont été observées lors de la mesure de la réponse induite par la forme membranaire du ligand (§ 1.3), d'inhibiteurs de PDE (§ 1.4) ou en présence du chélateur calcique BAPTA ([Figure V-6](#)). En effet, suite à un traitement des cellules avec le BAPTA, les amplitudes des réponses LPA et chimiokinerriques sont largement augmentées (respectivement +35% et +10% comparé aux mêmes signaux en absence de BAPTA) sans modification de la cinétique. Une modification de l'activité AC par le calcium est à exclure car la réponse FSK demeure inchangée. Pour la même raison, il ne semble pas non plus que cela résulte d'une modification de l'activité des PDE, à moins d'imaginer un effet exactement compensatoire entre deux actions du calcium : activatrice des AC et inhibitrice des PDE. Cet effet du calcium sur les réponses AMPc inhibitrices serait donc plutôt lié à une modulation d'un élément de la machinerie cellulaire mis en œuvre en aval du récepteur (RCK ou LPA-R) qui, en présence de calcium, limite l'amplitude de la réponse, comme cela a été montré dans la phototransduction rétinienne (Subbaraya, Ruiz et al. 1994; Gorczyca, Polans et al. 1995). On peut penser ici aux interactions RCK-GRK ou RCK-arrestine. L'utilisation de siRNA serait probablement une solution pour identifier le partenaire, sensible au calcium, impliqué dans la limitation de la réponse AMPc.

Rôle des récepteurs de surface

Nos données indiquent clairement que la première partie de la réponse chimiokinergique est contrôlée par les récepteurs présents en surface (cf. expérience utilisant F1, [Article - Figure 8A](#)) et qu'elle décroît quand les récepteurs commencent à internaliser ([Article - Figure 8B](#)) pour preuve l'inhibition de cette internalisation ralentie nettement le retour à zéro de la réponse ([Article - Figure 8B et 8C](#)). Pourtant, selon le modèle classique de l'activité des RCPG, ce n'est pas l'internalisation qui déclenche leur inactivation mais la liaison des β -arrestines. Et nos expériences de BRET montrent un recrutement très rapide (de l'ordre de la minute) des β -arrestines au niveau du CX3CR1 ([Résultats complémentaires– Figure V.9](#)). Or une addition de F1, 16 minutes après la chimiokine, reverse encore la réponse AMPc initiée par CX3CL1, ce qui signifie que les récepteurs sont en surface au moins durant les 16 premières minutes de la réponse chimiokinergique ([Article - Figure 8A](#)). Il y a donc ici contradiction.

Peut-on envisager qu'un CX3CR1 lié à une β -arrestine soit encore efficace pour transmettre un signal à Gi ?

Une explication possible est que le système BRET mesure un signal dans un système où les partenaires (ici β -arrestine et CX3CR1) sont surexprimés, ce qui modifie peut être la vitesse

du recrutement des β -arrestines comparé à celle des β -arrestines endogènes. Lors de la mesure de la réponse G_i , le recrutement des β -arrestines est peut-être plus lent que dans les expériences de BRET car l'interaction des protéines G_i présentes entrent en compétition, à force égales, avec les β -arrestines pour la liaison au récepteur.

Il est à noter que cette cinétique invariante des réponses chimiokinergiques se différencie des réponses plus rapides observées après activation des récepteurs du LPA (*Résultats complémentaires– Figure V.1*) et des réponses de plus grande amplitude observées en aval des récepteurs metabotropiques au glutamate (DiRaddo, Miller et al. 2014). Ceci explicite ce qui était déjà plus ou moins connu, à savoir que le système chimiokinergique est robuste et « répond » dans une grande variété d'environnements y compris en conditions inflammatoires où une élévation de l'AMPc est souvent rapportée. Or c'est dans ce cadre inflammatoire qu'une réponse chimiokinergique inhibitrice du signal AMPc est pertinente.

1.3. Une réponse AMPc induite par la forme membranaire du CX3CL1

La forme membranaire du CX3CL1 induit une réponse plus lente que la forme soluble

La forme membranaire du CX3CL1, inhabituelle pour une chimiokine, est souvent réduite à un rôle d'adhésion mécanique, induisant l'arrêt des cellules CX3CR1⁺ circulantes. C'est d'ailleurs de cette façon que le CX3CL1 a été découvert et associé au CX3CR1 (Bazan, Bacon et al. 1997). Nos résultats semblent indiquer qu'une signalisation existe en aval du récepteur activé par cette forme membranaire du CX3CL1 et que cette signalisation est cinétiquement différente de celle observée en aval du même récepteur activé par la forme soluble de la chimiokine. En effet, la réponse inhibitrice au CX3CL1 membranaire est maximale 30 minutes après la mise en contact des deux types cellulaires (HEK-CX3CR1 et L-CX3CL1) et se maintient plus d'une heure. Nous montrons en outre que cette cinétique, particulièrement lente, n'est pas due à un effet de « sédimentation » lent ou d'une arrivée progressive des cellules HEK_{glo}CX3CR1 mise en suspension et déposées sur un tapis de L-CX3CL1 (*Article - Figure S7*). Il y a donc un facteur intrinsèque et cellulaire qui explique le fait que la réponse au CX3CL1 membranaire est particulièrement lente. Les données obtenues nous amènent à penser que la faible internalisation du CX3CR1 activé par le CX3CL1 membranaire serait à l'origine de la cinétique observée, en particulier de son très lent retour à zéro.

La forme membranaire du CX3CL1 induit une réponse qualitativement différente de celle à la forme soluble

Nos résultats indiquent une autre différence quantitative entre la réponse due à la forme membranaire et celle obtenue avec la forme soluble. Bien que les deux formes de CX3CL1 induisent des réponses dont les amplitudes maximales sont comparables en pourcentage d'inhibition, à savoir environ 30% d'inhibition (Article - Figure 7) il existe une différence majeure entre ces deux réponses. La réponse au CX3CL1 soluble est saturante (Article - Figure S1) et une addition supplémentaire de CX3CL1 soluble ne donne aucun signal (Article - Figure 6). Par contre, l'addition de CX3CL1 soluble après la réponse obtenue avec du CX3CL1 membranaire induit une seconde vague de réponse (Article - Figure 7). Ce résultat semble indiquer que la forme membranaire induit une réponse de même amplitude que la forme soluble en mobilisant moins de récepteurs. Les résultats obtenus avec le CX3CL1-His ou CX3CL1 immobilisé soutiennent ce postulat d'une réponse au CX3CL1 membranaire qualitativement meilleure que celle due au CX3CL1 soluble. En effet la réponse obtenue avec le maximum possible de ligand immobilisé (150nM dans 30µl), présente une amplitude semblable à celle obtenue avec la dose saturante de CX3CL1 soluble ainsi qu'à celle obtenue avec CX3CL1 membranaire ; à un détail prêt que la courbe dose-réponse montre que cette réponse n'est pas saturante et que s'il était possible d'immobiliser plus de ligand, la réponse serait d'amplitude supérieure à celle mesurée.

En quoi le signal en aval du CX3CR1 est-il dépendant de la nature de son ligand ?

Une diffusion latérale du récepteur au sein de la membrane plasmique peut être un des paramètres expliquant une différence d'activation du récepteur en fonction de la forme de ligand. En effet, lors d'une activation par la forme soluble du CX3CL1, la diffusion du récepteur ne semble pas nécessaire : le ligand qui diffuse dans le milieu arrive au contact du récepteur. A l'inverse, lors de l'activation par la forme membranaire, le récepteur doit se déplacer au sein de la membrane afin d'entrer en contact avec son ligand. Des résultats obtenus au laboratoire montrent que le récepteur a une mobilité supérieure à celle du CX3CL1 membranaire, dont les mouvements sont restreints par sa forte glycosylation et son oligomérisation (Shenoy 2011). De plus il n'est pas impossible, que cette diffusion du récepteur soit à l'origine de la formation de dimères de CX3CR1 qui se rassemblent sous l'oligomère de CX3CL1 et se comportent ainsi en un complexe « transducteur » ou « réceptosome » au sein duquel leur conformation protéique est peut être différente que dans les récepteurs dispersés à la surface et activés par le ligand soluble. On aurait donc ici un facteur (temps de diffusion du CX3CR1 pour trouver son ligand sur la cellule partenaire) qui explique la lenteur d'apparition de la réponse. Quant à sa cinétique de retour retardée : on peut en effet penser qu'au sein du « réceptosome » la transduction du signal par le CX3CR1 est plus efficace et que son signal d'arrêt par recrutement des β -

arrestines et donc son internalisation est plus lente. C'est d'ailleurs ce que nous observons grâce au signal de BRET indiquant le recrutement des β -arrestines sur le CX3CR1 (**Résultats complémentaires– Figure V.9**).

Cette différence d'amplitude et de cinétique entre la réponse induite par la forme soluble et celle induite par la forme membranaire constitue le résultat majeur de cette étude. En effet, c'est la première fois qu'une différence de signalisation est observée. L'étude du signal calcique en 2001 par l'équipe d'Harrison n'avait révélé aucune différence entre les réponses aux deux formes de ligand. Il serait intéressant d'étudier les autres voies de signalisation, pour lesquelles des outils de mesure sont disponibles, comme par exemple la voie JNK, ERK ou des signaux encore plus distaux comme une phosphorylation différentielle des protéines cible de la PKA...

1.4. Rôle des PDE sur la régulation de la cinétique de retour de la réponse chimiokinergique

Il est largement admis que les PDE ont un rôle à jouer dans le contrôle des réponses de type Gs, particulièrement au cours de la phase de retour à zéro. La comparaison d'une réponse FSK seule versus FSK combinée avec de l'IBMX, révèle qu'il existe bien une forte activité PDE basale au sein des cellules HEKgloCX3CR1, ce qui permet sans doute de limiter l'augmentation de l'AMPc cellulaire induite par la FSK (**Article - Figure 4**). En présence d'IBMX, le signal enregistré est jusqu'à 10 fois supérieur à celui enregistré sous FSK seule. La réponse chimiokinergique étudiée après stimulation des cellules par de l'IBMX ou de la FSK combinée à l'IBMX, présente une cinétique légèrement différente de celle mesurée sous FSK seul. Deux différences sont à souligner : une réponse inhibitrice maximum atteinte au bout de 25 minutes en présence d'IBMX au lieu de 8 minutes sous FSK seule et une réponse dont le retour à zéro est retardé de plus d'une demi-heure. L'amplitude de cette réponse n'est toutefois pas modifiée.

Il est plutôt surprenant d'observer une réponse inhibitrice en présence d'IBMX. Si effectivement toutes les PDE sont inhibées, la concentration d'AMPc cellulaire devrait monter rapidement et atteindre un niveau saturant pour la sonde. Par ailleurs, à supposer que le niveau d'AMPc se stabilise d'une autre manière, il devrait être difficile de visualiser un signal inhibiteur car pour que le biocapteur soit sensible à une diminution de l'AMPc, il faut qu'il puisse se dissocier de l'AMPc et cela nécessite une dégradation de ce dernier. Le maintien d'une réponse AMPc inhibitrice visible sous IBMX peut être expliqué par différentes hypothèses non exclusives :

- Il existerait dans les HEK293 une activité PDE insensible à l'IBMX ; cependant les PDE7 et 8 identifiées comme insensibles à l'IBMX ne sont pas exprimées dans les HEK293, selon la littérature
- Dans nos conditions expérimentales, l'IBMX n'inhiberait pas complètement l'activité PDE et il reste une activité résiduelle suffisante pour visualiser la réponse
- Il existe un autre mécanisme d'élimination de l'AMPc cellulaire. Nous avons testé la possibilité d'une extrusion par les MRP (**Résultats complémentaires– Figure V.5**) or nos résultats n'indiquent aucune activité de ce type au sein des cellules HEKglcX3CR1.

Il faudrait pouvoir étudier directement l'activité PDE, mais il n'existe pas à notre connaissance de sonde capable de détecter séparément les activités de synthèse et de dégradation de l'AMPc. Il est peut être possible d'analyser cette dernière de manière indirecte en utilisant des analogues perméants de l'AMPc, hydrolysables ou non hydrolysables par la PDE. Cela permettrait de savoir qu'elle est exactement la variation d'activité PDE qui accompagne la réponse chimiokinergique. On peut penser qu'elle est simplement secondaire à la variation du niveau d'AMPc, régulée par un des effecteurs de la voie de transduction mise en œuvre, comme c'est le cas pour la PDE4 qui est régulée par phosphorylation PKA dépendante. Cette hypothèse a été testée avec l'utilisation d'inhibiteurs de la PKA (H-89 et KT5720). Or nous n'observons aucun effet de ces composés sur la réponse AMPc inhibitrice induite par les chimiokines (**Résultats complémentaires– Figure V.4**).

Une autre hypothèse serait l'existence d'un autre niveau de régulation au sein du « réceptosome » contenant le RCK, la Gi, l'adénylate cyclase, l'arrestine et la PDE comme l'ont montré Perry et al pour le récepteur β 2-adrénergique (Perry, Baillie et al. 2002).

1.5. AMPc, inflammation et fonctions du couple CX3CL1/CX3CR1

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre VI de ce manuscrit, l'AMPc est connu pour avoir un rôle pléiotrope dans l'inflammation et plus particulièrement comme immunosuppresseur. En effet, l'augmentation de l'AMPc lors des réponses inflammatoires fait partie d'un mécanisme endogène de régulation de la réponse inflammatoire, préservant ainsi les effets bénéfiques d'une réponse inflammatoire aiguë par rapport à une inflammation chronique généralement associée à une destruction tissulaire (Weissmann, Zurier et al. 1971; Harvath, Robbins et al. 1991).

Au cours d'expériences présentées dans la partie consacrées aux résultats complémentaires, nous avons étudié l'effet d'une augmentation de l'AMPc sur la fonction

chimiotactique et adhésive du couple CX3CR1/CX3CL1. Une augmentation de ce messager secondaire semble diminuer la capacité chimiotactique de nos cellules CX3CR1⁺, conformément à ce qui a déjà été dans la littérature pour d'autres chimiokines. Une controverse existe toutefois sur l'effecteur activé, PKA ou EPAC (Fine, Byrnes et al. 2001; O'Boyle, Brain et al. 2007).

Cette diminution du chimiotactisme s'accompagne d'une diminution de la capacité des cellules à adhérer sur le CX3CL1 membranaire (**Résultats complémentaires – Figure VI.2A et B**), qui comme on le sait est exprimé à la surface des cellules inflammées. Cet effet semble spécifique à l'adhésion CX3CL1/CX3CR1, puisqu'il n'affecte pas ou peu la capacité de ces mêmes cellules à adhérer sur la fibronectine (**Résultats complémentaires – Figure VI.2D**). Cette modulation de l'adhésion cellulaire par l'AMPc est décrite dans la littérature, particulièrement en ce qui concerne l'adhésion des monocytes sur des HUVEC (cellules endothéliales) (Laudanna, Campbell et al. 1997)

Par quel mécanisme et intermédiaire cellulaire passe la variation d'adhésion que nous observons ?

Dans notre modèle d'adhésion, il ne semble pas que la PKA soit impliquée puisque la baisse d'adhésion observée, suite au traitement de nos cellules avec de la FSK, n'est pas affectée par le traitement H-89. De plus cette diminution de l'adhésion n'est pas PTX sensible, ce qui nous laisse penser que ce phénomène d'adhésion par CX3CR1 est indépendant de la réponse AMPc inhibitrice observée en aval du même récepteur. Cette diminution de l'adhésion peut résulter d'une modification du récepteur (phosphorylation → changement conformationnel → désensibilisation partielle,...). L'hypothèse d'une diminution du nombre de récepteur en surface est exclue par nos expériences de cytométrie en flux (**Résultats complémentaires– Figure VI.2E et 2F Quantification du nombre de récepteur à la surface après FSK**). Il est possible d'imaginer un modèle où la réponse chimiokinergique inhibitrice est enclenchée secondairement après une adhésion purement mécanique entre CX3CR1 et CX3CL1. Cette réponse induit par la suite des mécanismes de renforcement de l'adhérence de la cellule adhérente via une activation du système intégrine.

A notre connaissance, c'est la première fois que l'on observe une régulation des fonctions du couple CX3CR1-CX3CL1 par l'AMPc cellulaire. Même si nous n'en connaissons pas les véritables causes mécanistiques, nous pouvons intégrer l'ensemble des données obtenues dans un modèle « finaliste » : En condition inflammatoire, l'augmentation de l'AMPc observée tendrait à diminuer la migration (chimiotactisme et adhésion) des cellules

qui réussissent à migrer et à adhérer, malgré cette augmentation de l'AMPc sont ainsi sélectionnées par leur capacité à diminuer leur AMPc cellulaire. L'AMPc cellulaire augmenterait ainsi le seuil fonctionnel à partir duquel les cellules immunes sont recrutées et activées au site inflammatoire, ce qui permet de contrôler la réponse immunitaire

1.6. AMPc, CX3CL1 et survie cellulaire

On sait que l'AMPc régule l'apoptose de façon positive ou négative selon les types cellulaires : il l'augmente dans les lymphocytes T et B (Grandoch, Bujok et al. 2009) ; il la diminue dans les neutrophiles ou les éosinophiles (Bureau, Seumois et al. 2002). Par ailleurs, la chimiokine CX3CL1 a un rôle important dans la survie cellulaire, plus particulièrement dans le système nerveux central (Boehme, Lio et al. 2000; Deiva, Geeraerts et al. 2004). Toutefois, cette action du CX3CL1 ne semble pas associée à la voie de signalisation Gi-AMPC-PKA mais à la voie PI3K-PKB (Deiva, Geeraerts et al. 2004).

Nos expériences préliminaires indiquent un rôle protecteur du CX3CL1 vis-à-vis de la mort cellulaire induite par une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Là encore, les mécanismes causals restent à identifier. On peut penser que cela est dû à la réponse inhibitrice d'AMPc. Si ce postulat est vrai, cette réponse chimiokinergique anti-apoptotique devrait être supprimée après traitement à la PTX. Il serait intéressant d'identifier le type d'apoptose engagée (*extrinsèque, mitochondriale ou autophagique*), les caspases impliquées mais surtout la branche (PKA ou EPAC) participant à cette réponse. Il faudrait enfin savoir si cette action anti-apoptotique est spécifique à CX3CL1. Quoiqu'il en soit, ce serait une avancée remarquable dans le déchiffrement du rôle protecteur de la chimiokine CX3CL1.

1.7. Rôle fonctionnel des réponses chimiokinergiques inhibitrices d'AMPc observées

L'intégration des différentes données obtenues au cours de ce travail nous permettent d'esquisser le modèle fonctionnel ci-après.

Dans un contexte inflammatoire sont secrétés de nombreux ligands, comme les prostaglandines, qui induisent une augmentation d'AMPc intracellulaire. Dans les cellules immunes, cela se traduit par une augmentation de la mort cellulaire et une diminution du recrutement des leucocytes en réponse à la sécrétion de chimiokine par les cellules inflammées. C'est un premier niveau de contrôle de la réponse inflammatoire aigüe. Les cellules recrutées malgré ce « frein » fonctionnel, le sont grâce à leurs réponses AMPc inhibitrices, qui favorise leur adhésion d'une part et leur résistance à l'apoptose d'autre part. Pour ce qui est du couple CX3CR1-CX3CL1, cette « sélection » concerne principalement les monocytes et les cellules NK, qui sont les principales cellules immunes CX3CR1⁺. La diminution de l'adhésion de ces cellules

sur l'endothélium inflammé exprimant le CX3CL1 membranaire constitue un second niveau de contrôle contribuant à diminuer le nombre de cellules participant à la réponse inflammatoire.

Nous avons montré que les réponses à plusieurs chimiokines ne présentaient pas de désensibilisation croisée, de même qu'une réponse à CX3CL1 membranaire n'empêchait pas une réponse au CX3CL1 soluble subséquente. Pour les monocytes, cela se traduit par une capacité de recrutement par plusieurs gradients chimiotactiques différents aboutissant à un maintien de la capacité d'adhésion sur l'endothélium inflammé grâce, entre autres, au CX3CL1 membranaire lui permettant de s'infiltrer jusqu'au centre du site inflammatoire. Un modèle fonctionnel similaire peut être décrit pour les NK. Après son recrutement au site inflammatoire, le NK adhère à sa cible (par exemple la cellule endothéliale) grâce au CX3CL1. Aussi, il est possible d'imaginer que la réponse AMPc inhibitrice enclenchée en aval du CX3CR1 renforce cette adhésion et protège la cellule de l'apoptose, tout en ne désensibilisant pas les réponses à d'autres chimiokines ou à CX3CL1 soluble qui permet à la cellule NK d'être recrutée ailleurs vers une autre cible et de maintenir sa fonction immune.

Notre équipe a montré que l'adhésion cellulaire passant par le couple CX3CL1-CX3CR1 était différent selon le variant du CX3CR1 humain engagé (Daoudi, Lavergne et al. 2004). C'est pour étudier ce polymorphisme que nous avons lancé cette étude. Malheureusement, la mise au point de la technique, et le travail de compréhension de la réponse à CX3CL1 membranaire ne m'a pas laissé le temps de creuser ce point. Quoi qu'il en soit, il serait intéressant maintenant d'étudier la signalisation AMPc en aval du variant minoritaire (CX3CR1-I289-M280) et ainsi d'identifier d'éventuelles différences avec les signaux décrits ici mesurés en aval du variant majoritaire (CX3CR1-V289-T280). Cette comparaison est intéressante car rappelons-le, la présence de ce variant est corrélée avec un risque accru de maladies cérébrovasculaires (Moatti, Faure et al. 2001; McDermott, Fong et al. 2003) et de DMLA (Combadiere, Feumi et al. 2007) ainsi qu'un risque moindre d'athérosclérose (McDermott, Halcox et al. 2001), de glioblastome (Rodero, Marie et al. 2008) et de sepsis (Chousterman en cours de publication).

Les devises Shadok



S'IL N'Y A PAS DE SOLUTION
C'EST QU'IL N'Y A PAS DE PROBLÈME.

Fiches Techniques

Milieux

Milieu de culture des cellules HEK-293

Ajouter au DMEM-Glutamax (life-technologie ©) :

10% de SVF (Dutscher ©) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30min

1mM Pyruvate de Sodium (life-technologie ©)

50U/ml Pénicilline

50U/ml Streptomycine

Milieu de culture des cellules THP-1 / U-937 / Jurkat-TAG

Ajouter au RPMI-Glutamax (life-technologie ©) :

10% de SVF (Dutscher ©) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30min

1mM Pyruvate de Sodium (life-technologie ©)

50U/ml Pénicilline

50U/ml Streptomycine

Mesure de la cinétique AMPc
Technique GloSENSOR Promega ©

Jour 1 : Culture cellulaire – mise en plaque des cellules

- Ensemencer les cellules (HEK-CX3CR1-GloSENSOR) à une densité de 30 000 cellules / 100µl de milieu de culture DMEM complet (cf. Fiche technique 0) dans une plaque blanche a fond transparent 96 puits (Greiner Bio-one ®)
- Incuber à 37°C – CO2 5% sous atmosphère humide

Jour 2 : Equilibration et Mesure en lecteur de plaque

- Eliminer le milieu de culture et remplacer par 100µl/puits milieu d'équilibration :

CO2independant medium (life-technologie ©) + 2% de reactif cAMP-GloSENSOR (Promega ®) + 10% de SVF décomplémenté.
- Incuber la plaque à 37°C – CO2 5% sous atmosphère humide – 90 minutes
- Mesurer l'absorbance en lecteur de plaque (Berthold ®) : Placer la plaque dans le support de l'appareil et lancer le programme « Kinetic Repeat » sur 3minutes. ce premier enregistrement servira à la représentation de la ligne de base. Sortir la plaque et additionner, à la multicanaux, 20µl de FSK à la concentration désirée, lancer un second enregistrement sur un temps donné. Sortir de nouveau la plaque et additionner 20µl des solutions de ligands. Enregistrer sur 1 à 2h.

NB : Les différentes drogues visant à moduler les différents acteurs de la signalisation sont souvent ajoutées dans cette solution dite d'équilibration.

BRET CX3CR1-LUC / β -arrestine YFP
Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Jour 1 : Culture cellulaire – mise en plaque des cellules

- Ensemencer les cellules (HEK-293) à une densité de 350 000 cellules / 2ml de milieu de culture DMEM complet (cf. Fiche technique 0) dans une plaque 6 puits traitées pour la culture
- Incuber à 37°C – CO₂ 5% sous atmosphère humide

Jour 2 : Transfection avec les plasmides codant CX3CR1-VT LUC et β -arrestine YFP (selon protocole fournisseur de l'agent transfectant JetPEI (polyplus ©))

- Tube ADN : 0.3µg de plasmide codant CX3CR1-LUC (donneur) + 2.8µg de plasmide codant la β -arrestine YFP (1 ou 2) (accepteur) ou pcDNA3 (contrôle négatif) – Solvant : NaCl 0.9% (100µl / puits6)
- Tube JetPEI (agent transfectant) : 6µl dans 100µl de NaCl 0.9% (valeurs pour 1 puits 6 à transfecter – ajuster en fonction du nombre de puits total)
- Vortexer les tubes
- Ajouter le contenu du tube JetPEI dans le tube ADN
- Vortexer le tube
- Incuber entre 15 et 30minutes à RT
- Distribuer 200µl de mix ADN + JetPEI par puits (la présence de SVF ne perturbe pas la transfection)
- Incuber à 37°C – CO₂ 5% sous atmosphère humide sur la nuit

Jour 3 : Mesure du BRET en lecteur de plaque

- Eliminer le milieu de culture
- Décoller les cellules au tampon de dissociation cellulaire (Life technologie ®)
- Pooler les duplicats et centrifuger à 1300rpm – 5min
- Eliminer le surnageant et reprendre les cellules en tampon BRET¹ à hauteur de 100 000 cellules / 180µl par point de mesure final
- Distribuer dans une plaque blanche totalement blanche, dite plaque de mesure (nunc ®) 5µM de coelenterazine h (interchim) diluée dans tampon BRET +/- chimiokine 100nM final pour un volume final de 20µl
- Distribuer 180µl de cellules par puits de la plaque de mesure

(1) Tampon BRET : HBSS complété par 10mM HEPES, 1mM de CaCl₂, 1mM MgCl₂

Programme :

- Mesure du BRET (*programme BRET Luc & YFP*) 100-300 répétitions

- Luciferase : λ emission F-485 Coelenterazine – slot A3
- YFP : λ emission F-530 eYFP – slot A4
- Mesure de la Fluorescence post BRET :
 - Basculer la tête du lecteur en position Fluorescence
 - Lancer le programme FluoYFP post BRET_Luc & YFP pour 1 -2 répétitions
 - lamp energy : 7000
 - λ excitation : F485 (FITC Fluorescein) – slot A2
 - λ emission : F 535 (FITC Fluorescein) – slot A2

Calcul :

- BRET BRUT

$$\text{valeur de BRET BRUT} = \frac{\text{luminescence nette de l'accepteur (530nm)}}{\text{luminescence nette du donneur (480nm)}}$$

où :

$$\begin{aligned} \text{luminescence nette} \\ = (\text{lumi des cells CX3CR1 luc et } \beta\text{arr YFP}) - (\text{lumi des cells pcDNA3}) \end{aligned}$$

- BRET NET

$$\begin{aligned} \text{valeur de BRET NET} = \\ \text{valeur de BRET brut des cells CX3CR1 luc et } \beta\text{arr YFP} - \\ \text{valeur BRET brut des cells CX3CR1 luc seul} \end{aligned}$$

FRET T-EPAC-VV

Fluorescence Resonance Energy Transfer

Jour 1 : Culture cellulaire – mise en plaque des cellules

- Ensemencer les cellules (HEK-CX3CR1 VT) à une densité de 20 000 cellules / 100µl de milieu de culture DMEM complet **sans rouge phenol** (Gibco ®) dans une plaque 96 puits, noires à fond transparent traitées pour la culture
- Incuber à 37°C – CO2 5% sous atmosphère humide

Jour 2 : Transfection avec le plasmide codant la sonde T-EPAC-vv (selon protocole fournisseur de l'agent transfectant JetPEI (polyplus ©))

- Tube ADN : 250ng de plasmide codant T-EPAC-vv – Solvant : NaCl 0.9% (10µl / puits 96)
- Tube JetPEI (agent transfectant) : 0.5µl dans 10µl de NaCl 0.9% (valeurs pour un puits 96 à transfecter – ajuster en fonction du nombre de puits total)
- Vortexer les tubes
- Ajouter le contenu du tube JetPEI dans le tube ADN
- Vortexer le tube
- Incuber entre 15 et 30minutes à RT
- Distribuer 20µl de mix ADN + JetPEI par puits (la présence de SVF ne perturbe pas la transfection)
- Incuber à 37°C – CO2 5% sous atmosphère humide sur la nuit

Jour 3 : Suivi du FRET par microscopie (microscope Zeiss ©)

Programme : programme constructeur Physiology ©

- Mesure du FRET (2 canaux de mesure)
 - CFP & YFP sur des cycle de 1h30 avec une prise toutes les 10s
- Calcul d'un ratio FRET en direct

$$\text{ratio FRET} = \frac{\text{fluorescence YFP (accepteur)}}{\text{fluorescence CFP (donneur)}}$$

Préparation de lamelles⁽¹⁾ « coatées » avec CX3CL1-His pour Adhésion sous flux

- Délimiter un cercle au feutre sur l'une des faces de la lamelle (*attention la surface de ce cercle doit être inférieure à celle de la chambre*)
- Retourner la lamelle et la placer sur du sopalin humidifié
- Déposer une goutte (~ 10µl) d'anticorps anti-Histidine⁽²⁾ au centre de la zone précédemment délimitée
- Incuber la lamelle 1H à 37°C (ou 1 nuit à 4°C)
- Retirer la solution d'anticorps sans toucher la zone traitée, garder le cône très superficiel
- Laver la zone traitée avec la solution de PBS, Ca, Mg (X3)
- Déposer une goutte (~10µl) de CX3CL1-His₆⁽³⁾ au centre de la zone traitée avec l'anticorps anti-Histidine
- Incuber la lamelle 1 nuit à 4°C (ou 1H à 37°C)
- Laver la zone traitée avec la solution de PBS, Ca, Mg (X3)
- Déposer une goutte de solution de saturation⁽⁴⁾ au centre de la zone traitée
- Incuber la lamelle 1H à 37°C
- Laver la zone traitée avec la solution de PBS, Ca, Mg (X3)
- Laisser à 37°C en solution PBS, Ca, Mg jusqu'à utilisation

Variante

Préparation de puits « coatés » avec CX3CL1-His pour mesure de la réponse AMPc via GloSENSOR technologie

- Déposer 40µl de solution d'anticorps anti-Histidine⁽²⁾ dans chaque puits d'une plaque blanche MAXISORP® (Dutscher ©)
- Incuber la plaque 1H à 37°C
- Retirer la solution d'anticorps, garder le cône très superficiel
- Laver les puits avec la solution de PBS, Ca, Mg (X3)
- Déposer 30 à 35µl de solution CX3CL1-His⁽³⁾ ou CXCL16-His dans les puits préalablement traités par l'anticorps
- Incuber la lamelle 1 nuit à 4°C (ou 1H à 37°C)
- Retirer la solution de chK-HIS avant le dépôt des cellules CX3CR1⁺

(1) Lamelle Thermanox – nunc®

(2) Solution d'anticorps anti-His : 1mM Ca⁺⁺, 1mM Mg⁺⁺, **25µg/ml Ac anti-His** en PBS

(3) Solution de CX3CL1-His₆ : 1mM Ca⁺⁺, 1mM Mg⁺⁺, **100nM CX3CL1-His₆** en PBS

(4) Solution de saturation : 1% BSA dénaturée²² 2 min à 80°C, 5% Sucrose en PBS

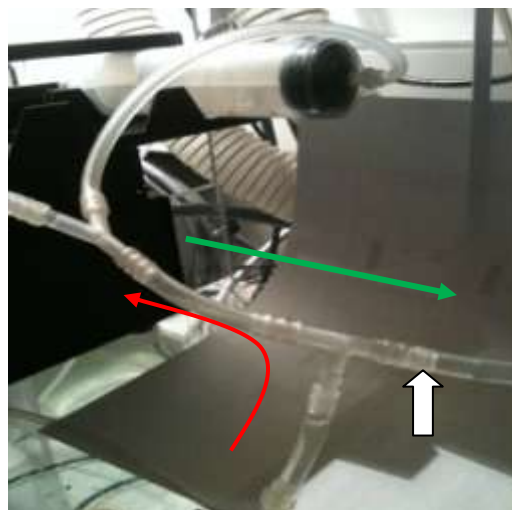
Adhésion sous flux sur lamelles « coatées »

- Allumer le climatiseur afin de maintenir la chambre à 37°C
- Préparer le tampon d'adhésion⁽¹⁾, le filtrer (0.8µM) et le placer à 37°C
- Laver le circuit en faisant passer de l'eau stérile (X2)
 - Plonger le tuyau de « remplissage » dans l'eau – robinet A fermé & « entrée circuit » fermée à l'aide d'une pince à dessin (*voir photo bas de page*)
 - Ouvrir le robinet A
 - Se placer en mode REFILL (débit et volume préenregistrés)
 - Démarrer le remplissage des seringues en appuyant sur RUN
 - Fermer le robinet A
 - Ouvrir l'« entrée circuit » et fermer le tuyau de « remplissage » avec le pince à dessin
 - Se placer en mode INFUSE
 - Régler le débit du flux : 2X 5000ml/hr (*uniquement pour les lavages*)
 - Set/ Infuse RATE/ entrer le débit désiré/ RUN
 - Chasser les bulles d'air formées dans les seringues en les plaçant verticalement.
 - Laver la seringue « entrée des cellules »
 - Vérifier l'écoulement dans la poubelle
- Remplir les seringues avec du tampon d'adhésion
 - Plonger le tuyau de « remplissage » dans le tampon – robinet A fermé – « entrée circuit » fermée à l'aide d'une pince à dessin
 - Ouvrir le robinet A
 - Se placer en mode REFILL (débit et volume préenregistrés)
 - Démarrer le remplissage des seringues en appuyant sur RUN
 - Fermer le robinet A
- Lancer le programme AXON Imaging
 - Ouvrir la palette director (*Acquisition/Ctrl/Palette*)
 - Lancer le live
 - Modifier selon l'image visible le temps d'exposition (~5-20ms)
 - Régler la netteté de l'image directement sur le microscope
- Monter la lamelle thermanox sur la chambre
 - Placer la lamelle sur le support
 - Recouvrir de tampon la lamelle
 - Branchez la seringue remplie de tampon à l'entrée
 - Evacuez les bulles du tuyau d'entrée en injectant du tampon
 - Placer doucement la chambre sur le support + lamelle en injectant du tampon et en évitant de créer des bulles.
 - Viser légèrement en diagonale la chambre
 - Finir de viser hermétiquement et vérifier l'étanchéité
 - Evacuer les bulles potentielles
 - Pincer le tuyau d'entrée à l'aide d'une pince à dessin
- Fixer la chambre montée sur la platine
- Commencer par brancher la sortie (l'aval = tuyau avec seringue – tuyau vers poubelle) enlever rapidement les pinces pour éviter de mettre sous pression le système.

- Lancer un flux à 2X 100ml/hr (Mode Infuse)
 - Branchez les tuyaux « entrée chambre » et « arrivée flux » en évitant un maximum la création de bulles.
 - Augmenter le flux 2X 500ml/hr pour chasser les bulles potentielles
 - Revenir à un flux de 2X 10ml/hr
 - Injecter les cellules (1million/ ml) dans la seringue « entrée des cellules »
 - Eliminer la bulle au fond de la seringue à l'aide d'un cône 200 μ l
 - Ouvrir le robinet et le refermer en laissant un volume mort dans la seringue
 - Lancer un chrono – 10 minutes
 - Prendre des photos de la zone traitée et de la zone non traitée (=adhésion non spécifique)
 - Arrêter le live
 - Fichier /Export as/data/
 - Renommer en format TIF
- Si réutilisation de la même lamelle pour tester l'adhésion sous d'autres conditions :**
- Augmenter le flux (500ml/hr durant 2 min) afin d'éliminer les cellules ayant adhéré
 - Laver la seringue d'entrée des cellules avec du tampon (5ml X3)
 - A la fin de la manipulation, faire un lavage à l'eau, à la javel, à l'eau du circuit, éliminer l'ensemble des pinces et laisser en eau les tuyaux.



Chambre pour adhésion sous flux.



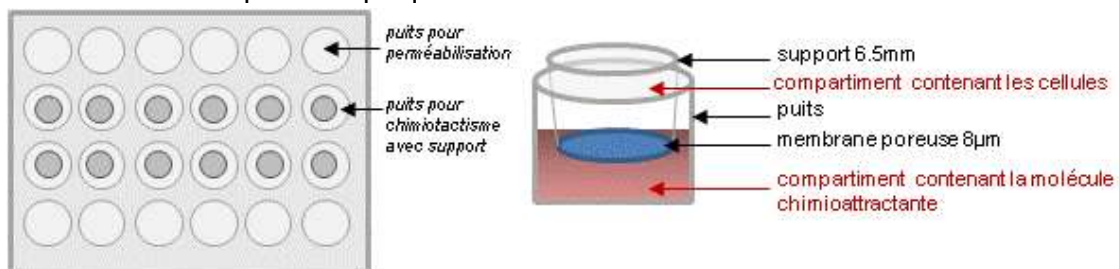
Circuit

(1) Tampon d'adhésion : HBSS 1X, 0.2% BSA, 1mM Ca⁺⁺, 1mM Mg⁺⁺, 10mM Hepes en H₂O pH=7.2

Chimiotactisme
Technique TRANSWELL® par Costar ©

Jour 1 : Culture cellulaire – mise en plaque des cellules et Perméabilisation de la plaque Transwell

- Perméabilisation des membranes
 - ajout de 600µl de milieu de culture neutre non complété dans les puits de la rangée 1 et 4
 - placer les supports de membrane dans ces puits et ajouter 150µl de milieu de culture neutre dans les supports, par-dessus la membrane
 - placer la plaque à 37°C sur la nuit



- Culture cellulaire
 - Ensemencer les cellules dans une flasque de culture en fonction de la quantité de cellules nécessaires le lendemain (150 000 cellules par points testés), en prenant en compte qu'elles ne doivent pas excéder 80% de confluence lors du test

Jour 2 : Test de migration

- Décoller les cellules avec du tampon de dissociation cellulaire
- Centrifuger 5min à 1300rpm avant de les reprendre en DMEM complet à hauteur de 1 000 000cell / ml
- Préparer la solution de chimiokine à 5µM finale – solvant : DMEM complet – Vf : 600µl/puits
- Distribuer cette solution de chimiokine dans les puits centraux (rang 2 et 3) de la plaque TRANSWELL
- Placer les supports de membranes perméabilisées sur ces puits
- Distribuer 150µl de solution cellulaire dans chaque support de membrane
- Incuber la plaque 5h à 37°C, 5% de CO2 en atmosphère humide

- Préparer une plaque de culture 24 puits avec 600µl de PBS 1X dans les puits de la rangée 1 et 4 et 600µl de méthanol froid dans les puits centraux (rangée 2 et 3)
- Au bout de 5H, procéder au lavage des supports de membrane :
 - Eliminer le contenu de chaque support de membrane
 - Plonger le support dans les puits contenant du PBS1X
 - Lavage de l'intérieur des supports avec 150µl de PBS 1X (x3)
 - Eliminer l'excédent de PBS avec un coton tige
 - Ajouter 100µl de PBS 1X propre pour éviter le desséchement de la membrane
 - Déplacer le support dans le puits contenant du méthanol froid
 - Placer la plaque 15 à 20 minutes à -20°C
 - Déplacer les supports dans des puits secs et laisser sécher à l'air libre 10 à 15 minutes
- Montage des membranes entre lame et lamelles à l'aide de Vectashiel © contenant du DAPI

Quantification du CX3CL1 soluble dans le surnageant cellulaire Technique Quantikine ELISA® par R&D Systems®

Jour 1 : Culture cellulaire

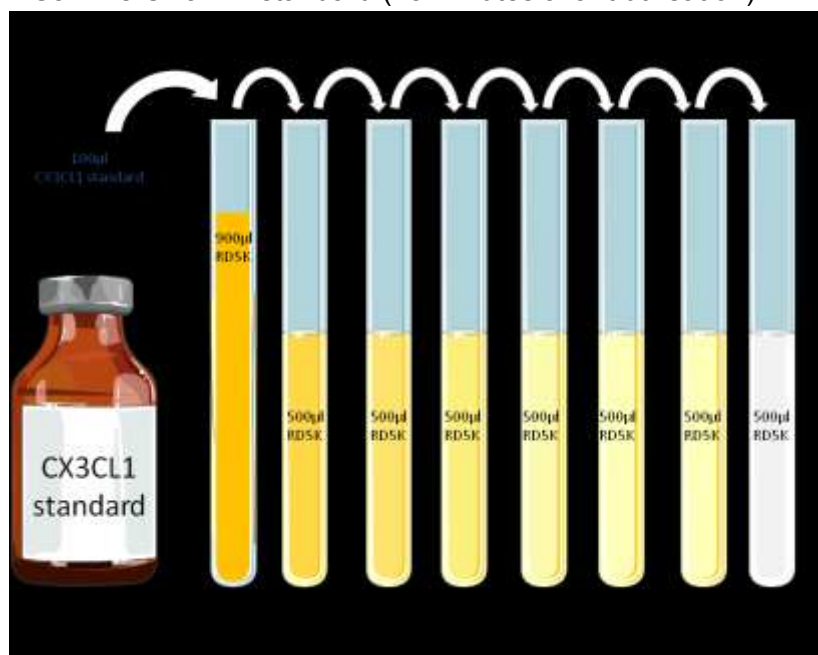
- Ensemencer dans une plaque de culture 96 puits avec les cellules dont le surnageant est à tester dans 100µl de milieu de culture à tester
- Incuber à 37°C – CO2 5% sous atmosphère humide

Jour 2 : Récupération des surnageants

- Eliminer le milieu de culture et remplacer par 100µl de milieu d'équilibration (cf. Fiche technique 1)
- Récupérer les surnageants dans des tubes falcons 0.5ml stérile – pooler les répliques
- Conserver à -20°C

Jour X : quantification du CX3CL1 dans les surnageants

- préparer les réactifs (placer les différentes solutions à RT avant utilisation)
 - Wash Buffer (**WB**) : 480ml de H₂O + 20ml de solution WB
 - Solution Substrat (15 minutes avant utilisation ; 100µl / puits) :
1vol de A (100µl) + 1vol de B (100µl)
 - Gamme CX3XL1 standard (15 minutes avant utilisation)



- préparer la plaque selon le plan de plaque désiré en retirant les barrettes excédentaires
- distribuer 100µl de **RD1-88** dans chaque puits

- déposer 100µl de chaque échantillon, contrôles et de la gamme CX3CL1 standard
- couvrir avec la bande adhésive fournie dans le kit
- incuber 3h à 4°C
- aspirer chaque puits et faire un lavage avec 400µl de **WB** (X4) – éliminer un maximum de liquide par aspiration et retournement de la plaque
- déposer 200µl de **CX3CL1 « conjugated »** froid (maintenu à 4°C) par puits
- incuber 1h à 4°C
- aspirer chaque puits et faire un lavage avec 400µl de **WB** (X4) – éliminer un maximum de liquide par aspiration et retournement de la plaque
- déposer 200µl de solution substrat par puits
- incuber 30minutes à RT en protégeant la plaque de la lumière
- additionner 50µl de **solution stop** par puits (la couleur vire du bleu au jaune)
- Mesure de l'absorbance à 450nm



Références Bibliographiques

A

- Aandahl, E. M., P. Aukrust, et al. (1998). "Protein kinase A type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **12**(10): 855-862.
- Adams, S. R., A. T. Harootunian, et al. (1991). "Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells." Nature **349**(6311): 694-697.
- Agarwal, R. and P. Agarwal (2014). "Newer targets for modulation of intraocular pressure: focus on adenosine receptor signaling pathways." Expert Opin Ther Targets **18**(5): 527-539.
- Agarwal, S. R., P. C. Yang, et al. (2014). "Role of membrane microdomains in compartmentation of cAMP signaling." PLoS One **9**(4): e95835.
- Ahr, B., M. Denizot, et al. (2005). "Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation." The Journal of biological chemistry **280**(8): 6692-6700.
- Aldinucci, D. and A. Colombatti (2014). "The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression." Mediators of inflammation **2014**: 292376.
- Ali, S., A. C. Palmer, et al. (2000). "Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans." J Biol Chem **275**(16): 11721-11727.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-1958.
- Allen, M. D. and J. Zhang (2006). "Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters." Biochem Biophys Res Commun **348**(2): 716-721.
- Anbazzhagan, K., I. Duroux-Richard, et al. (2014). "Transcriptomic Network Support Distinct Roles of Classical and Non-Classical Monocytes in Human." International reviews of immunology.
- Ancuta, P., R. Rao, et al. (2003). "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." The Journal of experimental medicine **197**(12): 1701-1707.
- Andre, F., N. Cabioglu, et al. (2006). "Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer." Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO **17**(6): 945-951.
- Andrzejewski, M. G., A. Koelsch, et al. (2010). "Distinct role of the intracellular C-terminus for subcellular expression, shedding and function of the murine transmembrane chemokine CX3CL1." Biochemical and biophysical research communications **395**(2): 178-184.
- Angiolillo, A. L., C. Sgadari, et al. (1995). "Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo." The Journal of experimental medicine **182**(1): 155-162.
- Apostolakis, S., E. Krambovitis, et al. (2007). "CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators." Thrombosis research **121**(3): 387-395.
- Appay, V., A. Brown, et al. (1999). "Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. Characterization of nonaggregating, noninflammatory RANTES mutants." The Journal of biological chemistry **274**(39): 27505-27512.
- Arai, H. and I. F. Charo (1996). "Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors." The Journal of biological chemistry **271**(36): 21814-21819.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, et al. (2004). "Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP." Journal of immunology **173**(1): 559-565.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, et al. (2005). "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1." Journal of immunology **174**(2): 595-599.
- Aronoff, D. M., J. K. Carstens, et al. (2006). "Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of

lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis." Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research **26**(11): 827-833.

Averaimo, S. and X. Nicol (2014). "Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits." Front Cell Neurosci **8**: 376.

B

Bacskai, B. J., B. Hochner, et al. (1993). "Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons." Science **260**(5105): 222-226.

Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.

Baggiolini, M. and P. Loetscher (2000). "Chemokines in inflammation and immunity." Immunol Today **21**(9): 418-420.

Baillie, G. S. (2009). "Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases." The FEBS journal **276**(7): 1790-1799.

Baillie, G. S. and M. D. Houslay (2005). "Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes." Current opinion in cell biology **17**(2): 129-134.

Bajetto, A., S. Barbero, et al. (2001). "Stromal cell-derived factor-1 α induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway." Journal of neurochemistry **77**(5): 1226-1236.

Bannert, N., S. Craig, et al. (2001). "Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines." J Exp Med **194**(11): 1661-1673.

Barlic, J. and P. M. Murphy (2007). "An oxidized lipid-peroxisome proliferator-activated receptor gamma-chemokine pathway in the regulation of macrophage-vascular smooth muscle cell adhesion." Trends in cardiovascular medicine **17**(8): 269-274.

Barlic, J., Y. Zhang, et al. (2007). "Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNF α -NF κ B-dependent manner." The Journal of biological chemistry **282**(26): 19167-19176.

Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature **385**(6617): 640-644.

Becker, C., C. Taube, et al. (2009). "Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells." Blood **114**(6): 1263-1269.

Becker, Y. (2007). "The spreading of HIV-1 infection in the human organism is caused by fractalkine trafficking of the infected lymphocytes--a review, hypothesis and implications for treatment." Virus genes **34**(2): 93-109.

Belperio, J. A., M. P. Keane, et al. (2000). "CXC chemokines in angiogenesis." Journal of leukocyte biology **68**(1): 1-8.

Bengis-Garber, C. and N. Gruener (1996). "Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst." Cellular signalling **8**(4): 291-296.

Bernardini, G., D. Ribatti, et al. (2003). "Analysis of the role of chemokines in angiogenesis." Journal of immunological methods **273**(1-2): 83-101.

Betz, M. and B. S. Fox (1991). "Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." Journal of immunology **146**(1): 108-113.

Bisset, L. R. and P. Schmid-Grendelmeier (2005). "Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective." Current opinion in pulmonary medicine **11**(1): 35-42.

Blanpain, C., V. Wittamer, et al. (2001). "Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways." J Biol Chem **276**(26): 23795-23804.

- Bockaert, J., S. Claeyssen, et al. (2002). "G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication." *Int Rev Cytol* **212**: 63-132.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *The EMBO journal* **18**(7): 1723-1729.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *EMBO J* **18**(7): 1723-1729.
- Bockaert, J., G. Roussignol, et al. (2004). "GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions." *Biochemical Society transactions* **32**(Pt 5): 851-855.
- Boehme, S. A., F. M. Lio, et al. (2000). "The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia." *Journal of immunology* **165**(1): 397-403.
- Bokoch, G. M. and A. G. Gilman (1984). "Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin." *Cell* **39**(2 Pt 1): 301-308.
- Bonacci, T. M., J. L. Mathews, et al. (2006). "Differential targeting of Gbetagamma-subunit signaling with small molecules." *Science* **312**(5772): 443-446.
- Bos, J. L. (2003). "Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research." *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**(9): 733-738.
- Bos, J. L., K. de Bruyn, et al. (2003). "The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion." *Biochemical Society transactions* **31**(Pt 1): 83-86.
- Bouvier, M., W. P. Hausdorff, et al. (1988). "Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization." *Nature* **333**(6171): 370-373.
- Brand, S., K. Hofbauer, et al. (2006). "Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype." *The American journal of gastroenterology* **101**(1): 99-106.
- Brdicka, T., D. Pavlistova, et al. (2000). "Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation." *The Journal of experimental medicine* **191**(9): 1591-1604.
- Brew, R., J. S. Erikson, et al. (2000). "Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro." *Cytokine* **12**(1): 78-85.
- Brown, Z., M. E. Gerritsen, et al. (1994). "Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma." *Am J Pathol* **145**(4): 913-921.
- Broxmeyer, H. E. (2008). "Chemokines in hematopoiesis." *Current opinion in hematology* **15**(1): 49-58.
- Brumme, Z. L., W. W. Dong, et al. (2003). "Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response." *AIDS* **17**(2): 201-208.
- Bryn, T., M. Mahic, et al. (2006). "The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages." *Journal of immunology* **176**(12): 7361-7370.
- Brzostowski, J. A. and A. R. Kimmel (2001). "Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors." *Trends in biochemical sciences* **26**(5): 291-297.
- Bureau, F., G. Seumois, et al. (2002). "CD40 engagement enhances eosinophil survival through induction of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression: Possible involvement in allergic inflammation." *The Journal of allergy and clinical immunology* **110**(3): 443-449.
- Butcher, R. W. and E. W. Sutherland (1962). "Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine." *The Journal of biological chemistry* **237**: 1244-1250.
- By, Y., J. M. Durand-Gorde, et al. (2010). "Monoclonal antibody-assisted stimulation of adenosine A2A receptors induces simultaneous downregulation of CXCR4 and CCR5 on CD4+ T-cells." *Human immunology* **71**(11): 1073-1076.

C

- Calebiro, D., V. Nikolaev, et al. (2009). "Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors." PLoS biology **7**(8).
- Cambien, B., M. Pomeranz, et al. (2001). "Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocytic cell adhesion." Blood **97**(7): 2031-2037.
- Campbell, D. J., C. H. Kim, et al. (2003). "Chemokines in the systemic organization of immunity." Immunological reviews **195**: 58-71.
- Canetti, C., C. H. Serezani, et al. (2007). "Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of FcγR phagocytosis by prostaglandin E2 in alveolar macrophages." Journal of immunology **179**(12): 8350-8356.
- Cardona, A. E., E. P. Pioro, et al. (2006). "Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor." Nature neuroscience **9**(7): 917-924.
- Castro, L. R., E. Guiot, et al. (2014). "Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors." Biotechnol J **9**(2): 192-202.
- Ceresa, B. P. and L. E. Limbird (1994). "Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of α2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts α2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling." The Journal of biological chemistry **269**(47): 29557-29564.
- Ceyhan, G. O., S. Deucker, et al. (2009). "Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **89**(3): 347-361.
- Chapman, G. A., K. E. Moores, et al. (2000). "The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium." European journal of pharmacology **392**(3): 189-195.
- Chasse, S. A. and H. G. Dohman (2003). "RGS proteins: G protein-coupled receptors meet their match." Assay Drug Dev Technol **1**(2): 357-364.
- Chen, S., D. Luo, et al. (2002). "TGF-β1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia." Journal of neuroimmunology **133**(1-2): 46-55.
- Chen, Y., S. R. Green, et al. (2006). "The amino terminus and the third extracellular loop of CX3CR1 contain determinants critical for distinct receptor functions." Molecular pharmacology **69**(3): 857-865.
- Chu, L., X. Li, et al. (2009). "Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor in endotoxin-induced uveitis." Ophthalmic research **42**(3): 160-166.
- Chu, Y., X. Yang, et al. (2007). "In situ expression of IFN-γ-inducible T cell α chemoattractant in breast cancer mounts an enhanced specific anti-tumor immunity which leads to tumor regression." Cancer immunology, immunotherapy : CII **56**(10): 1539-1549.
- Clapham, D. E. and E. J. Neer (1997). "G protein βγ subunits." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 167-203.
- Clark-Lewis, I., K. S. Kim, et al. (1995). "Structure-activity relationships of chemokines." Journal of leukocyte biology **57**(5): 703-711.
- Clark-Lewis, I., K. S. Kim, et al. (1995). "Structure-activity relationships of chemokines." J Leukoc Biol **57**(5): 703-711.
- Clark, A. K., P. K. Yip, et al. (2009). "The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(21): 6945-6954.
- Clore, G. M. and A. M. Gronenborn (1995). "Three-dimensional structures of α and β chemokines." FASEB J **9**(1): 57-62.
- Combadiere, B., S. Faure, et al. (2003). "The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients." AIDS **17**(9): 1279-1290.

- Combadiere, C., S. K. Ahuja, et al. (1995). "Cloning, chromosomal localization, and RNA expression of a human beta chemokine receptor-like gene." DNA and cell biology **14**(8): 673-680.
- Combadiere, C., C. Feumi, et al. (2007). "CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration." The Journal of clinical investigation **117**(10): 2920-2928.
- Combadiere, C., S. Potteaux, et al. (2003). "Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice." Circulation **107**(7): 1009-1016.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, et al. (1998). "Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1." The Journal of biological chemistry **273**(37): 23799-23804.
- Conche, C., G. Boulla, et al. (2009). "T cell adhesion primes antigen receptor-induced calcium responses through a transient rise in adenosine 3',5'-cyclic monophosphate." Immunity **30**(1): 33-43.
- Contento, R. L., B. Molon, et al. (2008). "CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10101-10106.
- Cooper, D. M. (2005). "Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling." Biochemical Society transactions **33**(Pt 6): 1319-1322.
- Cotter, R., C. Williams, et al. (2002). "Fractalkine (CX3CL1) and brain inflammation: Implications for HIV-1-associated dementia." Journal of neurovirology **8**(6): 585-598.
- Cullere, X., S. K. Shaw, et al. (2005). "Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase." Blood **105**(5): 1950-1955.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-2102.
- Cyster, J. G. (2000). "Leukocyte migration: scent of the T zone." Current biology : CB **10**(1): R30-33.

D

- Daoudi, M., E. Lavergne, et al. (2004). "Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1." The Journal of biological chemistry **279**(19): 19649-19657.
- Daoudi, M., E. Lavergne, et al. (2004). "Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1." J Biol Chem **279**(19): 19649-19657.
- Darbandi-Tehrani, K., P. Hermand, et al. (2010). "Subtle conformational changes between CX3CR1 genetic variants as revealed by resonance energy transfer assays." FASEB J **24**(11): 4585-4598.
- Dascal, N. (2001). "Ion-channel regulation by G proteins." Trends Endocrinol Metab **12**(9): 391-398.
- David, M., E. Petricoin, 3rd, et al. (1996). "Activation of protein kinase A inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells." The Journal of biological chemistry **271**(9): 4585-4588.
- Davis, C. N. and J. K. Harrison (2006). "Proline 326 in the C terminus of murine CX3CR1 prevents G-protein and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of Akt and extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells." J Pharmacol Exp Ther **316**(1): 356-363.
- de Bruyn, K. M., S. Rangarajan, et al. (2002). "The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion." The Journal of biological chemistry **277**(33): 29468-29476.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, et al. (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**(6710): 474-477.

- Deiva, K., T. Geeraerts, et al. (2004). "Fractalkine reduces N-methyl-D-aspartate-induced calcium flux and apoptosis in human neurons through extracellular signal-regulated kinase activation." *The European journal of neuroscience* **20**(12): 3222-3232.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-666.
- Dessauer, C. W., T. T. Scully, et al. (1997). "Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase." *J Biol Chem* **272**(35): 22272-22277.
- Dhawan, P. and A. Richmond (2002). "Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma." *Journal of leukocyte biology* **72**(1): 9-18.
- DiPilato, L. M., X. Cheng, et al. (2004). "Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16513-16518.
- DiRaddo, J. O., E. J. Miller, et al. (2014). "A real-time method for measuring cAMP production modulated by G α hi/o-coupled metabotropic glutamate receptors." *J Pharmacol Exp Ther* **349**(3): 373-382.
- Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." *The Journal of biological chemistry* **273**(49): 32377-32379.

E

- Ebert, L. M., P. Schaerli, et al. (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." *Mol Immunol* **42**(7): 799-809.
- Eigler, A., B. Siegmund, et al. (1998). "Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production." *Journal of leukocyte biology* **63**(1): 101-107.
- Enserink, J. M., L. S. Price, et al. (2004). "The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the α 3 β 1 integrin but not the α 6 β 4 integrin." *The Journal of biological chemistry* **279**(43): 44889-44896.
- Esche, C., C. Stellato, et al. (2005). "Chemokines: key players in innate and adaptive immunity." *The Journal of investigative dermatology* **125**(4): 615-628.
- Evans, V. A., G. Khoury, et al. (2012). "HIV persistence: chemokines and their signalling pathways." *Cytokine & growth factor reviews* **23**(4-5): 151-157.

F

- Faure, S., L. Meyer, et al. (2000). "Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1." *Science* **287**(5461): 2274-2277.
- Faure, S., L. Meyer, et al. (2003). "Deleterious genetic influence of CX3CR1 genotypes on HIV-1 disease progression." *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **32**(3): 335-337.
- Feniger-Barish, R., D. Belkin, et al. (2000). "GCP-2-induced internalization of IL-8 receptors: hierarchical relationships between GCP-2 and other ELR(+)-CXC chemokines and mechanisms regulating CXCR2 internalization and recycling." *Blood* **95**(5): 1551-1559.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* **53**(1): 1-24.
- Ferrandon, S., T. N. Feinstein, et al. (2009). "Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis." *Nature chemical biology* **5**(10): 734-742.
- Figueiredo, K. A., A. L. Mui, et al. (2006). "Relaxin stimulates leukocyte adhesion and migration through a relaxin receptor LGR7-dependent mechanism." *The Journal of biological chemistry* **281**(6): 3030-3039.
- Fine, J. S., H. D. Byrnes, et al. (2001). "Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis." *Inflammation* **25**(2): 61-67.
- Fong, A. M., S. M. Alam, et al. (2002). "CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion." *J Biol Chem* **277**(22): 19418-19423.

- Fong, A. M., H. P. Erickson, et al. (2000). "Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX(3)C chemokine domain presentation." The Journal of biological chemistry **275**(6): 3781-3786.
- Fong, A. M., R. T. Premont, et al. (2002). "Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(11): 7478-7483.
- Fong, A. M., L. A. Robinson, et al. (1998). "Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow." The Journal of experimental medicine **188**(8): 1413-1419.
- Fourmy, D., C. Escriet, et al. (2002). "Structure of cholecystokinin receptor binding sites and mechanism of activation/inactivation by agonists/antagonists." Pharmacol Toxicol **91**(6): 313-320.
- Foussat, A., L. Bouchet-Delbos, et al. (2001). "Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients." Blood **98**(6): 1678-1686.
- Fredriksson, R. and H. B. Schioth (2005). "The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes." Molecular pharmacology **67**(5): 1414-1425.
- Friedl, P. and B. Weigelin (2008). "Interstitial leukocyte migration and immune function." Nature immunology **9**(9): 960-969.
- Fuhrmann, M., T. Bittner, et al. (2010). "Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease." Nature neuroscience **13**(4): 411-413.

G

- Galkina, E. and K. Ley (2007). "Leukocyte influx in atherosclerosis." Current drug targets **8**(12): 1239-1248.
- Ganju, R. K., S. A. Brubaker, et al. (1998). "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." The Journal of biological chemistry **273**(36): 23169-23175.
- Gao, Y. J. and R. R. Ji (2010). "Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain." Pharmacology & therapeutics **126**(1): 56-68.
- Garcia, G. E., Y. Xia, et al. (2000). "NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS." Journal of leukocyte biology **67**(4): 577-584.
- Garin, A., N. Tarantino, et al. (2003). "Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors." Journal of immunology **171**(10): 5305-5312.
- Garton, K. J., P. J. Gough, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." J Biol Chem **276**(41): 37993-38001.
- Gaudin, F., S. Nasreddine, et al. (2011). "Identification of the chemokine CX3CL1 as a new regulator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer." PLoS One **6**(7): e21546.
- Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- Gevrey, J. C., B. M. Isaac, et al. (2005). "Syk is required for monocyte/macrophage chemotaxis to CX3CL1 (Fractalkine)." Journal of immunology **175**(6): 3737-3745.
- Ghilardi, G., M. L. Biondi, et al. (2004). "Internal carotid artery occlusive disease and polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1: a genetic risk factor." Stroke; a journal of cerebral circulation **35**(6): 1276-1279.
- Gill, D. M. and R. Meren (1978). "ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(7): 3050-3054.

- Goaillard, J. M. and P. Vincent (2002). "Serotonin suppresses the slow afterhyperpolarization in rat intralaminar and midline thalamic neurones by activating 5-HT(7) receptors." J Physiol **541**(Pt 2): 453-465.
- Goaillard, J. M., P. V. Vincent, et al. (2001). "Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca²⁺ current in single frog ventricular myocytes." J Physiol **530**(Pt 1): 79-91.
- Goda, S., T. Imai, et al. (2000). "CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms." Journal of immunology **164**(8): 4313-4320.
- Godessart, N. and S. L. Kunkel (2001). "Chemokines in autoimmune disease." Current opinion in immunology **13**(6): 670-675.
- Gorczyca, W. A., A. S. Polans, et al. (1995). "Guanylyl cyclase activating protein. A calcium-sensitive regulator of phototransduction." The Journal of biological chemistry **270**(37): 22029-22036.
- Gorshkov, K. and J. Zhang (2014). "Visualization of cyclic nucleotide dynamics in neurons." Front Cell Neurosci **8**: 395.
- Gosling, J., S. Slaymaker, et al. (1999). "MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B." The Journal of clinical investigation **103**(6): 773-778.
- Grammatopoulos, D. K., H. S. Randeva, et al. (2001). "Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins." Journal of neurochemistry **76**(2): 509-519.
- Grandoch, M., V. Bujok, et al. (2009). "Epac inhibits apoptosis of human leukocytes." Journal of leukocyte biology **86**(4): 847-849.
- Granger, D. N. and P. Kubes (1994). "The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion." Journal of leukocyte biology **55**(5): 662-675.
- Graves, D. T. and Y. Jiang (1995). "Chemokines, a family of chemotactic cytokines." Crit Rev Oral Biol Med **6**(2): 109-118.
- Green, S. R., K. H. Han, et al. (2006). "The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK." Journal of immunology **176**(12): 7412-7420.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." Molecular cell **2**(2): 275-281.
- Guillet-Deniau, I., A. F. Burnol, et al. (1997). "Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway." The Journal of biological chemistry **272**(23): 14825-14829.
- Guo, J., T. Chen, et al. (2003). "Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1." Immunology letters **89**(1): 1-7.
- Guo, J., M. Zhang, et al. (2003). "Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells." International journal of cancer. Journal international du cancer **103**(2): 212-220.
- Gutkind, J. S. (1998). "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades." The Journal of biological chemistry **273**(4): 1839-1842.

H

- Han, K. H., J. W. Ryu, et al. (2014). "Vascular expression of the chemokine CX3CL1 promotes osteoclast recruitment and exacerbates bone resorption in an irradiated murine model." Bone **61C**: 91-101.
- Handel, T. M., Z. Johnson, et al. (2008). "An engineered monomer of CCL2 has anti-inflammatory properties emphasizing the importance of oligomerization for chemokine activity in vivo." J Leukoc Biol **84**(4): 1101-1108.

- Hannigan, M., L. Zhan, et al. (2002). "Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(6): 3603-3608.
- Hanoune, J. and N. Defer (2001). "Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms." Annual review of pharmacology and toxicology **41**: 145-174.
- Haraguchi, S., R. A. Good, et al. (1995). "Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns." Immunology today **16**(12): 595-603.
- Harrison, J. K., C. M. Barber, et al. (1994). "cDNA cloning of a G-protein-coupled receptor expressed in rat spinal cord and brain related to chemokine receptors." Neuroscience letters **169**(1-2): 85-89.
- Harrison, J. K., Y. Jiang, et al. (1998). "Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(18): 10896-10901.
- Harvath, L., J. D. Robbins, et al. (1991). "cAMP and human neutrophil chemotaxis. Elevation of cAMP differentially affects chemotactic responsiveness." J Immunol **146**(1): 224-232.
- Haskell, C. A., M. D. Cleary, et al. (1999). "Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation." The Journal of biological chemistry **274**(15): 10053-10058.
- Haskell, C. A., M. D. Cleary, et al. (2000). "Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion." The Journal of biological chemistry **275**(44): 34183-34189.
- Haskell, C. A., W. W. Hancock, et al. (2001). "Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection." The Journal of clinical investigation **108**(5): 679-688.
- Hazan-Eitan, Z., Y. Weinstein, et al. (2006). "Induction of Fc gammaRIIA expression in myeloid PLB cells during differentiation depends on cytosolic phospholipase A2 activity and is regulated via activation of CREB by PGE2." Blood **108**(5): 1758-1766.
- He, R., D. D. Browning, et al. (2001). "Differential roles of the NPXXY motif in formyl peptide receptor signaling." Journal of immunology **166**(6): 4099-4105.
- Hempel, A., T. Noll, et al. (1996). "Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers." The American journal of physiology **270**(4 Pt 2): H1264-1271.
- Henney, C. S. and L. M. Lichtenstein (1971). "The role of cyclic AMP in the cytolytic activity of lymphocytes." Journal of immunology **107**(2): 610-612.
- Hensbergen, P. J., P. G. Wijnands, et al. (2005). "The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis." Journal of immunotherapy **28**(4): 343-351.
- Hermant, P., F. Pincet, et al. (2008). "Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain." The Journal of biological chemistry **283**(44): 30225-30234.
- Hermann-Kleiter, N., N. Thuille, et al. (2006). "PKCtheta and PKA are antagonistic partners in the NF-AT transactivation pathway of primary mouse CD3+ T lymphocytes." Blood **107**(12): 4841-4848.
- Hermans, E. (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." Pharmacology & therapeutics **99**(1): 25-44.
- Hernanz-Falcon, P., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2004). "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization." Nature immunology **5**(2): 216-223.
- Heuss, C. and U. Gerber (2000). "G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors." Trends Neurosci **23**(10): 469-475.
- Hewavitharana, T. and P. B. Wedegaertner (2012). "Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins." Cellular signalling **24**(1): 25-34.

- Hildebrandt, J. D. (1997). "Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins." Biochem Pharmacol **54**(3): 325-339.
- Hilkens, C. M., A. Snijders, et al. (1996). "Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory cell-derived products." The European respiratory journal. Supplement **22**: 90s-94s.
- Hirsch, E., V. L. Katanaev, et al. (2000). "Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation." Science **287**(5455): 1049-1053.
- Hofmann, B., P. Nishanian, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus proteins induce the inhibitory cAMP/protein kinase A pathway in normal lymphocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(14): 6676-6680.
- Hofmann, B., P. Nishanian, et al. (1993). "Restoration of T-cell function in HIV infection by reduction of intracellular cAMP levels with adenosine analogues." AIDS **7**(5): 659-664.
- Houslay, M. D. (2010). "Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown." Trends in biochemical sciences **35**(2): 91-100.
- Houslay, M. D., G. S. Baillie, et al. (2007). "cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling." Circulation research **100**(7): 950-966.
- Huang, Y. W., P. Su, et al. (2009). "Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases." The Journal of biological chemistry **284**(43): 29644-29653.
- Hughes, P. M., M. S. Botham, et al. (2002). "Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS." Glia **37**(4): 314-327.
- Hundhausen, C., A. Schulte, et al. (2007). "Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes." Journal of immunology **178**(12): 8064-8072.
- Hunton, D. L., W. G. Barnes, et al. (2005). "Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis." Mol Pharmacol **67**(4): 1229-1236.

I

- Imai, T., K. Hieshima, et al. (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." Cell **91**(4): 521-530.
- Imaizumi, T., T. Matsumiya, et al. (2000). "Interferon-gamma stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells." The Tohoku journal of experimental medicine **192**(2): 127-139.
- Imaizumi, T., H. Yoshida, et al. (2004). "Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells." Journal of atherosclerosis and thrombosis **11**(1): 15-21.
- Irannejad, R., J. Tomshine, et al. (2013). "Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes." Nature **495**(7442): 534-538.

J

- Jaakola, V. P., M. T. Griffith, et al. (2008). "The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist." Science **322**(5905): 1211-1217.
- Jacquelin, S., F. Licata, et al. (2013). "CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice." Blood **122**(5): 674-683.
- Jamieson, W. L., S. Shimizu, et al. (2008). "CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism." Cancer research **68**(6): 1715-1722.
- Jarnagin, K., D. Grunberger, et al. (1999). "Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2." Biochemistry **38**(49): 16167-16177.

- Johnson, Z., M. H. Kosco-Vilbois, et al. (2004). "Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system." *J Immunol* **173**(9): 5776-5785.
- Joost, P. and A. Methner (2002). "Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands." *Genome biology* **3**(11): RESEARCH0063.
- Josefsson, L. G. (1999). "Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors." *Gene* **239**(2): 333-340.
- Jung, S., J. Aliberti, et al. (2000). "Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." *Molecular and cellular biology* **20**(11): 4106-4114.

K

- Kaibuchi, K., S. Kuroda, et al. (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." *Annual review of biochemistry* **68**: 459-486.
- Kammer, G. M. (1988). "The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response." *Immunology today* **9**(7-8): 222-229.
- Kaneko, T., R. Alvarez, et al. (1995). "Elevated intracellular cyclic AMP inhibits chemotaxis in human eosinophils." *Cellular signalling* **7**(5): 527-534.
- Kansra, V., C. Groves, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent extracellular calcium influx is essential for CX(3)CR1-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade." *The Journal of biological chemistry* **276**(34): 31831-31838.
- Karagiannis, E. D. and A. S. Popel (2008). "Novel anti-angiogenic peptides derived from ELR-containing CXC chemokines." *Journal of cellular biochemistry* **104**(4): 1356-1363.
- Kasai, R. S. and A. Kusumi (2014). "Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization." *Current opinion in cell biology* **27**: 78-86.
- Kaupp, U. B. and R. Seifert (2002). "Cyclic nucleotide-gated ion channels." *Physiological reviews* **82**(3): 769-824.
- Kawabuchi, M., Y. Satomi, et al. (2000). "Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases." *Nature* **404**(6781): 999-1003.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." *Science* **282**(5397): 2275-2279.
- Keeley, E. C., B. Mehrad, et al. (2011). "Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization." *Experimental cell research* **317**(5): 685-690.
- Kerfoot, S. M., S. E. Lord, et al. (2003). "Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment." *European journal of immunology* **33**(3): 729-739.
- Kiefer, F. and A. F. Siekmann (2011). "The role of chemokines and their receptors in angiogenesis." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**(17): 2811-2830.
- Kim, J., T. Mori, et al. (2006). "Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome." *Annals of surgery* **244**(1): 113-120.
- Klarenbeek, J. B., J. Goedhart, et al. (2011). "A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range." *PLoS One* **6**(4): e19170.
- Klemke, R. L., S. Cai, et al. (1997). "Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase." *The Journal of cell biology* **137**(2): 481-492.
- Knall, C., S. Young, et al. (1996). "Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils." *The Journal of biological chemistry* **271**(5): 2832-2838.
- Kohout, T. A., S. L. Nicholas, et al. (2004). "Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7." *The Journal of biological chemistry* **279**(22): 23214-23222.

- Koizumi, K., Y. Saitoh, et al. (2009). "Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption." Journal of immunology **183**(12): 7825-7831.
- Kolakowski, L. F., Jr. (1994). "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database." Receptors & channels **2**(1): 1-7.
- Kollmar, O., K. Rupertus, et al. (2007). "Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis." Neoplasia **9**(10): 862-870.
- Kraft, K., H. Olbrich, et al. (2001). "Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization." The Journal of biological chemistry **276**(37): 34408-34418.
- Krupinski, J., F. Coussen, et al. (1989). "Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure." Science **244**(4912): 1558-1564.
- Kuklina, E. M. and S. V. Shirshov (2000). "Role of cAMP-dependent signal transduction in the control of T lymphocyte activation." Biochemistry. Biokhimiia **65**(6): 629-639.
- Kumar, A., K. N. Kremer, et al. (2011). "Galpha13 and Rho mediate endosomal trafficking of CXCR4 into Rab11+ vesicles upon stromal cell-derived factor-1 stimulation." J Immunol **186**(2): 951-958.
- Kumar, A. H., P. Metharom, et al. (2010). "Bone marrow-derived CX3CR1 progenitors contribute to neointimal smooth muscle cells via fractalkine CX3CR1 interaction." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **24**(1): 81-92.
- Kumar, R., V. Tripathi, et al. (2012). "CXCR7 mediated Gialpha independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells." Cellular immunology **272**(2): 230-241.
- Kumari, T., B. Pant, et al. (2009). "A model for the evaluation of domain based classification of GPCR." Bioinformation **4**(4): 138-142.
- Kuschert, G. S., F. Coulin, et al. (1999). "Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses." Biochemistry **38**(39): 12959-12968.

L

- Lapidot, T., A. Dar, et al. (2005). "How do stem cells find their way home?" Blood **106**(6): 1901-1910.
- Laudanna, C., J. J. Campbell, et al. (1997). "Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants." J Biol Chem **272**(39): 24141-24144.
- Lavergne, E., B. Combadiere, et al. (2003). "Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo." Cancer research **63**(21): 7468-7474.
- Lavergne, E., C. Combadiere, et al. (2004). "Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration." J Immunol **173**(6): 3755-3762.
- Lazennec, G. and A. Richmond (2010). "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." Trends in molecular medicine **16**(3): 133-144.
- Lee, H. W., H. J. Choi, et al. (2013). "Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments." Biochimica et biophysica acta **1835**(2): 170-179.
- Lee, S., N. H. Varvel, et al. (2010). "CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models." The American journal of pathology **177**(5): 2549-2562.
- Lefkowitz, R. J., J. Pitcher, et al. (1998). "Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization." Adv Pharmacol **42**: 416-420.
- Lemay, J., S. Marullo, et al. (2005). "On the dimerization of CCR5." Nature immunology **6**(6): 535; author reply 535-536.
- Leong, S. R., H. B. Lowman, et al. (1997). "IL-8 single-chain homodimers and heterodimers: interactions with chemokine receptors CXCR1, CXCR2, and DARC." Protein Sci **6**(3): 609-617.

- Li, C., J. N. Liu, et al. (1995). "Urokinase-type plasminogen activator-induced monocyte adhesion requires a carboxyl-terminal lysine and cAMP-dependent signal transduction." The Journal of biological chemistry **270**(51): 30282-30285.
- Lindia, J. A., E. McGowan, et al. (2005). "Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain." The journal of pain : official journal of the American Pain Society **6**(7): 434-438.
- Liu, X., G. Lu, et al. (2011). "Silencing CX3CR1 production modulates the interaction between dendritic and endothelial cells." Molecular biology reports **38**(1): 481-488.
- Locati, M., E. Riboldi, et al. (2001). "Regulation of the chemokine system at the level of chemokine receptor expression and signaling activity." Immunobiology **204**(5): 536-542.
- Loetscher, P., B. Moser, et al. (2000). "Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection." Advances in immunology **74**: 127-180.
- Loetscher, P., M. Seitz, et al. (1996). "Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes." The Journal of experimental medicine **184**(2): 569-577.
- Lohse, M. and D. Calebiro (2013). "Cell biology: Receptor signals come in waves." Nature **495**(7442): 457-458.
- Lohse, M. J. and D. Calebiro (2013). "Cell biology: Receptor signals come in waves." Nature **495**(7442): 457-458.
- Lorenowicz, M. J., J. van Gils, et al. (2006). "Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis." Journal of leukocyte biology **80**(6): 1542-1552.
- Lowes, V. L., N. Y. Ip, et al. (2002). "Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors." Neuro-Signals **11**(1): 5-19.
- Lucas, A. D., C. Bursill, et al. (2003). "Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1)." Circulation **108**(20): 2498-2504.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-445.
- Luster, A. D. and P. Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." The Journal of experimental medicine **178**(3): 1057-1065.
- Luttrell, L. M., G. J. Della Rocca, et al. (1997). "Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation." J Biol Chem **272**(7): 4637-4644.
- Lyons, A., A. M. Lynch, et al. (2009). "Fractalkine-induced activation of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway attenuates microglial activation in vivo and in vitro." Journal of neurochemistry **110**(5): 1547-1556.

M

- MacKenzie, S. J., G. S. Baillie, et al. (2002). "Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1)." British journal of pharmacology **136**(3): 421-433.
- Mahalingam, S. and G. Karupiah (1999). "Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases." Immunol Cell Biol **77**(6): 469-475.
- Makranz, C., G. Cohen, et al. (2006). "cAMP cascade (PKA, Epac, adenylyl cyclase, Gi, and phosphodiesterases) regulates myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II in microglia and macrophages." Glia **53**(4): 441-448.
- Malbon, C. C. (2004). "Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **9**: 1048-1058.
- Marchesi, F., M. Locatelli, et al. (2010). "Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer." Journal of neuroimmunology **224**(1-2): 39-44.

- Marchesi, F., L. Piemonti, et al. (2008). "The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer research **68**(21): 9060-9069.
- Marchildon, G. A., J. E. Casnellie, et al. (1984). "Covalently bound myristate in a lymphoma tyrosine protein kinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**(24): 7679-7682.
- Mariani, M., R. Lang, et al. (2004). "Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells." European journal of immunology **34**(1): 231-240.
- Martin, E. L., D. G. Souza, et al. (2010). "Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment." American journal of respiratory and critical care medicine **182**(6): 762-773.
- Masci, A. M., M. Galgani, et al. (2003). "HIV-1 gp120 induces anergy in naive T lymphocytes through CD4-independent protein kinase-A-mediated signaling." Journal of leukocyte biology **74**(6): 1117-1124.
- Matsumiya, T., K. Ota, et al. (2010). "Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1." Journal of immunology **184**(8): 4205-4214.
- McCudden, C. R., M. D. Hains, et al. (2005). "G-protein signaling: back to the future." Cell Mol Life Sci **62**(5): 551-577.
- McDermott, D. H., A. M. Fong, et al. (2003). "Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans." J Clin Invest **111**(8): 1241-1250.
- McDermott, D. H., J. P. Halcox, et al. (2001). "Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis." Circulation research **89**(5): 401-407.
- Métrich, M., A. Lucas, et al. (2008). "Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy." Circulation research **102**(8): 959-965.
- Meucci, O., A. Fatatis, et al. (2000). "Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(14): 8075-8080.
- Milligan, E. D., E. M. Sloane, et al. (2008). "Glia in pathological pain: a role for fractalkine." Journal of neuroimmunology **198**(1-2): 113-120.
- Milligan, E. D., V. Zapata, et al. (2004). "Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats." The European journal of neuroscience **20**(9): 2294-2302.
- Milligan, G. and E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." British journal of pharmacology **147 Suppl 1**: S46-55.
- Milligan, G. and J. H. White (2001). "Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors." Trends in pharmacological sciences **22**(10): 513-518.
- Mizoue, L. S., J. F. Bazan, et al. (1999). "Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1." Biochemistry **38**(5): 1402-1414.
- Mizuno, T., J. Kawanokuchi, et al. (2003). "Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system." Brain research **979**(1-2): 65-70.
- Moatti, D., S. Faure, et al. (2001). "Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease." Blood **97**(7): 1925-1928.
- Molon, B., G. Gri, et al. (2005). "T cell costimulation by chemokine receptors." Nature immunology **6**(5): 465-471.
- Moriguchi, M., B. D. Hissong, et al. (2005). "CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3." The Journal of biological chemistry **280**(17): 17408-17414.
- Moser, B. and K. Willmann (2004). "Chemokines: role in inflammation and immune surveillance." Ann Rheum Dis **63 Suppl 2**: ii84-ii89.

- Mukaida, N. and T. Baba (2012). "Chemokines in tumor development and progression." Experimental cell research **318**(2): 95-102.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56.
- Mullershausen, F., F. Zecri, et al. (2009). "Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors." Nature chemical biology **5**(6): 428-434.
- Muralidhar, G. G. and M. V. Barbolina (2014). "Chemokine receptors in epithelial ovarian cancer." International journal of molecular sciences **15**(1): 361-376.
- Murphy, P. M. (1994). "The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors." Annu Rev Immunol **12**: 593-633.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacological reviews **52**(1): 145-176.
- Murray, A. J. (2008). "Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems." Science signaling **1**(22): re4.

N

- Nakagawa, T., T. Sakurai, et al. (2005). "Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors." Science **307**(5715): 1638-1642.
- Nambu, M., M. Morita, et al. (1989). "Regulation of Fc gamma receptor expression and phagocytosis of a human monoblast cell line U937. Participation of cAMP and protein kinase C in the effects of IFN-gamma and phorbol ester." Journal of immunology **143**(12): 4158-4165.
- Nardelli, B., H. L. Tiffany, et al. (1999). "Characterization of the signal transduction pathway activated in human monocytes and dendritic cells by MPIF-1, a specific ligand for CC chemokine receptor 1." Journal of immunology **162**(1): 435-444.
- Navab, M., S. S. Imes, et al. (1991). "Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein." The Journal of clinical investigation **88**(6): 2039-2046.
- Navarro, J., C. Punzon, et al. (1998). "Inhibition of phosphodiesterase type IV suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication and cytokine production in primary T cells: involvement of NF-kappaB and NFAT." Journal of virology **72**(6): 4712-4720.
- Neptune, E. R. and H. R. Bourne (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(26): 14489-14494.
- Nevo, I., O. Sagi-Assif, et al. (2009). "The involvement of the fractalkine receptor in the transmigration of neuroblastoma cells through bone-marrow endothelial cells." Cancer letters **273**(1): 127-139.
- Nikolaev, V. O. and M. J. Lohse (2006). "Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells." Physiology (Bethesda) **21**: 86-92.
- Nishimura, M., H. Umehara, et al. (2002). "Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression." Journal of immunology **168**(12): 6173-6180.
- Nishiyori, A., M. Minami, et al. (1998). "Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia?" FEBS letters **429**(2): 167-172.
- Nokta, M. and R. Pollard (1991). "Human immunodeficiency virus infection: association with altered intracellular levels of cAMP and cGMP in MT-4 cells." Virology **181**(1): 211-217.
- Northup, J. K., P. C. Sternweis, et al. (1980). "Purification of the regulatory component of adenylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6516-6520.
- Nukiwa, M., S. Andarini, et al. (2006). "Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors." European journal of immunology **36**(4): 1019-1027.



- O'Boyle, G., J. G. Brain, et al. (2007). "Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2." *Mol Immunol* **44**(8): 1944-1953.
- Ohta, M., F. Tanaka, et al. (2005). "The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients." *International journal of oncology* **26**(1): 41-47.
- Okada, M., S. Nada, et al. (1991). "CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases." *The Journal of biological chemistry* **266**(36): 24249-24252.
- Ollivier, V., S. Faure, et al. (2003). "Fractalkine/CX3CL1 production by human aortic smooth muscle cells impairs monocyte procoagulant and inflammatory responses." *Cytokine* **21**(6): 303-311.
- Ostuni, M. A., J. Guellec, et al. (2014). "CX3CL1, a chemokine finely tuned to adhesion: critical roles of the stalk glycosylation and the membrane domain." *Biol Open* **3**(12): 1173-1182.
- Ottaiano, A., A. di Palma, et al. (2005). "Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells." *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **54**(8): 781-791.
- Ozaki, N., T. Shibasaki, et al. (2000). "cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis." *Nature cell biology* **2**(11): 805-811.



- Paolini, J. F., D. Willard, et al. (1994). "The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations." *J Immunol* **153**(6): 2704-2717.
- Park, P. S. and J. W. Wells (2004). "Oligomeric potential of the M2 muscarinic cholinergic receptor." *Journal of neurochemistry* **90**(3): 537-548.
- Passam, A. M., G. Sourvinos, et al. (2007). "Polymorphisms of Cx(3)CR1 and CXCR6 receptors in relation to HAART therapy of HIV type 1 patients." *AIDS research and human retroviruses* **23**(8): 1026-1032.
- Pease, J. E. (2006). "Asthma, allergy and chemokines." *Current drug targets* **7**(1): 3-12.
- Peraire, J., F. Vidal, et al. (2007). "Polymorphisms in the 3' untranslated region of the fractalkine (CX3CL1) gene and the risk of HIV-1 infection and disease progression." *AIDS* **21**(7): 891-893.
- Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, et al. (2005). "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." *J Biol Chem* **280**(11): 9895-9903.
- Percherancier, Y., T. Planchenault, et al. (2001). "Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor." *J Biol Chem* **276**(34): 31936-31944.
- Pereira, C. F., J. Middel, et al. (2001). "Enhanced expression of fractalkine in HIV-1 associated dementia." *Journal of neuroimmunology* **115**(1-2): 168-175.
- Perry, S. J., G. S. Baillie, et al. (2002). "Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins." *Science* **298**(5594): 834-836.
- Piiper, A. and S. Zeuzem (2004). "Receptor tyrosine kinases are signaling intermediates of G protein-coupled receptors." *Current pharmaceutical design* **10**(28): 3539-3545.
- Pin, J. P., T. Galvez, et al. (2003). "Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors." *Pharmacology & therapeutics* **98**(3): 325-354.
- Pitcher, J. A., R. A. Hall, et al. (1998). "The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin." *J Biol Chem* **273**(20): 12316-12324.
- Ponsioen, B., J. Zhao, et al. (2004). "Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator." *EMBO Rep* **5**(12): 1176-1180.

- Ponsioen, B., J. Zhao, et al. (2004). "Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator." EMBO reports **5**(12): 1176-1180.
- Popovic, M., Y. Laumonnier, et al. (2008). "Thrombin-induced expression of endothelial CX3CL1 potentiates monocyte CCL2 production and transendothelial migration." Journal of leukocyte biology **84**(1): 215-223.
- Poupel, L., A. Boissonnas, et al. (2013). "Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **33**(10): 2297-2305.
- Prabhu, Y. and L. Eichinger (2006). "The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors." European journal of cell biology **85**(9-10): 937-946.
- Prinster, S. C., C. Hague, et al. (2005). "Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance." Pharmacological reviews **57**(3): 289-298.

R

- Rajaratnam, K., B. D. Sykes, et al. (1994). "Neutrophil activation by monomeric interleukin-8." Science **264**(5155): 90-92.
- Raman, D., T. Sobolik-Delmaire, et al. (2011). "Chemokines in health and disease." Experimental cell research **317**(5): 575-589.
- Randolph, G. J. and M. B. Furie (1995). "A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro." Journal of immunology **155**(7): 3610-3618.
- Randriamampita, C., G. Boulla, et al. (2003). "T cell adhesion lowers the threshold for antigen detection." European journal of immunology **33**(5): 1215-1223.
- Rangarajan, S., J. M. Enserink, et al. (2003). "Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor." The Journal of cell biology **160**(4): 487-493.
- Rangarajan, S., J. M. Enserink, et al. (2003). "Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor." The Journal of cell biology **160**(4): 487-493.
- Raport, C. J., V. L. Schweickart, et al. (1995). "The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues." Gene **163**(2): 295-299.
- Rasmussen, T. N., I. Novak, et al. (2004). "Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment." Eur J Biochem **271**(22): 4366-4374.
- Reape, T. J. and P. H. Groot (1999). "Chemokines and atherosclerosis." Atherosclerosis **147**(2): 213-225.
- Reedquist, K. A., E. Ross, et al. (2000). "The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion." The Journal of cell biology **148**(6): 1151-1158.
- Rich, T. C., K. A. Fagan, et al. (2000). "Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion." The Journal of general physiology **116**(2): 147-161.
- Richardson, R. M., B. C. Pridgen, et al. (1998). "Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation." The Journal of biological chemistry **273**(37): 23830-23836.
- Rimaniol, A. C., S. J. Till, et al. (2003). "The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis." The Journal of allergy and clinical immunology **112**(6): 1139-1146.
- Robishaw, J. D. and C. H. Berlot (2004). "Translating G protein subunit diversity into functional specificity." Current opinion in cell biology **16**(2): 206-209.
- Robison, G. A. and E. W. Sutherland (1971). "Cyclic AMP and the function of eukaryotic cells: an introduction." Ann N Y Acad Sci **185**: 5-9.

- Rodbell, M. (1992). "The role of GTP-binding proteins in signal transduction: from the sublimely simple to the conceptually complex." Current topics in cellular regulation **32**: 1-47.
- Rodbell, M., H. M. Krans, et al. (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon." J Biol Chem **246**(6): 1872-1876.
- Rodero, M., Y. Marie, et al. (2008). "Polymorphism in the microglial cell-mobilizing CX3CR1 gene is associated with survival in patients with glioblastoma." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **26**(36): 5957-5964.
- Rodriguez-Frade, J. M., G. del Real, et al. (2004). "Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor." The EMBO journal **23**(1): 66-76.
- Rodriguez-Frade, J. M., M. Mellado, et al. (2001). "Chemokine receptor dimerization: two are better than one." Trends in immunology **22**(11): 612-617.
- Rogue, P. J., J. P. Humbert, et al. (1998). "cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca²⁺-ATPase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(16): 9178-9183.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.
- Rose, J. J., J. F. Foley, et al. (2004). "On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2." The Journal of biological chemistry **279**(23): 24372-24386.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-242.
- Rostene, W., A. Guyon, et al. (2011). "Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations." Front Neuroendocrinol **32**(1): 10-24.
- Rot, A. (1992). "Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration." Immunol Today **13**(8): 291-294.
- Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells." Annual review of immunology **22**: 891-928.
- Rovati, G. E., V. Capra, et al. (2007). "The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state." Molecular pharmacology **71**(4): 959-964.
- Rowland-Jones, S. L., S. Pinheiro, et al. (2001). "How important is the 'quality' of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection?" Immunology letters **79**(1-2): 15-20.

S

- Saederup, N., L. Chan, et al. (2008). "Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis." Circulation **117**(13): 1642-1648.
- Salcedo, R. and J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." Microcirculation **10**(3-4): 359-370.
- Salcedo, R., M. L. Ponce, et al. (2000). "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression." Blood **96**(1): 34-40.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2000). "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression." Immunological reviews **177**: 134-140.
- Sampath, J., M. Adachi, et al. (2002). "Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy." AAPS pharmSci **4**(3): E14.
- Sato, K., H. Kawasaki, et al. (2000). "TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors." Journal of immunology **164**(5): 2285-2295.

- Schaerli, P. and B. Moser (2005). "Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic." Immunol Res **31**(1): 57-74.
- Schimanski, C. C., S. Schwald, et al. (2005). "Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **11**(5): 1743-1750.
- Schnurr, M., T. Toy, et al. (2005). "Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway." Blood **105**(4): 1582-1589.
- Schwarz, N., J. Pruessmeyer, et al. (2010). "Requirements for leukocyte transmigration via the transmembrane chemokine CX3CL1." Cellular and molecular life sciences : CMLS **67**(24): 4233-4248.
- Sgadari, C., J. M. Farber, et al. (1997). "Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo." Blood **89**(8): 2635-2643.
- Shan, S., T. Hong-Min, et al. (2011). "New evidences for fractalkine/CX3CL1 involved in substantia nigral microglial activation and behavioral changes in a rat model of Parkinson's disease." Neurobiology of aging **32**(3): 443-458.
- Shenoy, S. K. (2011). "beta-arrestin-biased signaling by the beta-adrenergic receptors." Curr Top Membr **67**: 51-78.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-1273.
- Shi, G., S. Partida-Sanchez, et al. (2007). "Identification of an alternative G{alpha}q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes." The Journal of experimental medicine **204**(11): 2705-2718.
- Shirshov, S. V. (2010). "[Mechanisms of immune tolerance in physiological pregnancy]." Uspekhi fiziologicheskikh nauk **41**(1): 75-93.
- Sierro, F., C. Biben, et al. (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14759-14764.
- Signoret, N., L. Hewlett, et al. (2005). "Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent." Molecular biology of the cell **16**(2): 902-917.
- Singh, K. K., M. D. Hughes, et al. (2005). "Genetic polymorphisms in CX3CR1 predict HIV-1 disease progression in children independently of CD4+ lymphocyte count and HIV-1 RNA load." The Journal of infectious diseases **191**(11): 1971-1980.
- Skalhegg, B. S., B. F. Landmark, et al. (1992). "Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes." The Journal of biological chemistry **267**(22): 15707-15714.
- Snijdwint, F. G., P. Kalinski, et al. (1993). "Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes." Journal of immunology **150**(12): 5321-5329.
- Sprang, S. R., Z. Chen, et al. (2007). "Structural basis of effector regulation and signal termination in heterotrimeric Galpha proteins." Adv Protein Chem **74**: 1-65.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-314.
- Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol **57**: 827-872.
- Stamatovic, S. M., R. F. Keep, et al. (2006). "CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor." Journal of immunology **177**(4): 2651-2661.
- Strieter, R. M., M. D. Burdick, et al. (2005). "CXC chemokines in angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 593-609.
- Strieter, R. M., P. J. Polverini, et al. (1995). "The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis." Shock **4**(3): 155-160.
- Strieter, R. M., P. J. Polverini, et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." J Biol Chem **270**(45): 27348-27357.

- Subbaraya, I., C. C. Ruiz, et al. (1994). "Molecular characterization of human and mouse photoreceptor guanylate cyclase-activating protein (GCAP) and chromosomal localization of the human gene." The Journal of biological chemistry **269**(49): 31080-31089.
- Sun, Y., Z. Cheng, et al. (2002). "Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation." The Journal of biological chemistry **277**(51): 49212-49219.
- Sun, Y., L. Li, et al. (2000). "Infection of CD4+ memory T cells by HIV-1 requires expression of phosphodiesterase 4." Journal of immunology **165**(4): 1755-1761.
- Sunahara, R. K. and R. Taussig (2002). "Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling." Molecular interventions **2**(3): 168-184.
- Sunahara, R. K., J. J. Tesmer, et al. (1997). "Crystal structure of the adenylyl cyclase activator Gsalpha." Science **278**(5345): 1943-1947.

T

- Tang, H. L. and J. G. Cyster (1999). "Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells." Science **284**(5415): 819-822.
- Tasken, K. and A. Ruppelt (2006). "Negative regulation of T-cell receptor activation by the cAMP-PKA-Csk signalling pathway in T-cell lipid rafts." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **11**: 2929-2939.
- Terrin, A., G. Di Benedetto, et al. (2006). "PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases." The Journal of cell biology **175**(3): 441-451.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nature immunology **2**(2): 129-134.
- Thivierge, M., C. Le Gouill, et al. (1998). "Prostaglandin E2 induces resistance to human immunodeficiency virus-1 infection in monocyte-derived macrophages: downregulation of CCR5 expression by cyclic adenosine monophosphate." Blood **92**(1): 40-45.
- Toth, P. T., D. Ren, et al. (2004). "Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study." J Pharmacol Exp Ther **310**(1): 8-17.
- Tsou, C. L., C. A. Haskell, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine." J Biol Chem **276**(48): 44622-44626.

U

- Umehara, H., E. Bloom, et al. (2001). "Fractalkine and vascular injury." Trends in immunology **22**(11): 602-607.
- Umehara, H., E. T. Bloom, et al. (2004). "Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **24**(1): 34-40.
- Urano, D., J. C. Jones, et al. (2012). "G protein activation without a GEF in the plant kingdom." PLoS genetics **8**(6): e1002756.
- Usynin, I., C. Klotz, et al. (2007). "Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells." Cellular microbiology **9**(11): 2610-2628.

V

- van der Pouw Kraan, T. C., L. C. Boeije, et al. (1995). "Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production." The Journal of experimental medicine **181**(2): 775-779.
- Vang, T., K. M. Torgersen, et al. (2001). "Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor." The Journal of experimental medicine **193**(4): 497-507.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, et al. (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(8): 4903-4908.

- Veldkamp, C. T., C. Seibert, et al. (2006). "Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12)." *J Mol Biol* **359**(5): 1400-1409.
- Venkatesan, S., J. J. Rose, et al. (2003). "Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4." *Molecular biology of the cell* **14**(8): 3305-3324.
- Verbeke, H., K. Geboes, et al. (2012). "The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer." *Biochimica et biophysica acta* **1825**(1): 117-129.
- Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." *FASEB J* **13**(13): 1699-1710.
- Vitale, S., B. Cambien, et al. (2007). "Tissue-specific differential antitumour effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer." *Gut* **56**(3): 365-372.
- Vives, R. R., E. Crublet, et al. (2004). "A novel strategy for defining critical amino acid residues involved in protein/glycosaminoglycan interactions." *J Biol Chem* **279**(52): 54327-54333.
- Volovyk, Z. M., M. J. Wolf, et al. (2006). "Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover." *J Biol Chem* **281**(14): 9773-9780.

W

- Walser, T. C., S. Rifat, et al. (2006). "Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer." *Cancer research* **66**(15): 7701-7707.
- Walsh, D. A., J. P. Perkins, et al. (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." *J Biol Chem* **243**(13): 3763-3765.
- Wan, W. and P. M. Murphy (2013). "Regulation of atherogenesis by chemokines and chemokine receptors." *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **61**(1): 1-14.
- Wang, H. Y., T. Liu, et al. (2006). "Structure-function analysis of Frizzleds." *Cellular signalling* **18**(7): 934-941.
- Wang, J., L. He, et al. (2006). "Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions." *Mol Cancer Ther* **5**(10): 2474-2483.
- Ward, S., Y. Sotsios, et al. (2003). "Therapeutic potential of phosphoinositide 3-kinase inhibitors." *Chemistry & biology* **10**(3): 207-213.
- Warne, T., M. J. Serrano-Vega, et al. (2008). "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* **454**(7203): 486-491.
- Weissmann, G., R. B. Zurier, et al. (1971). "Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles." *J Exp Med* **134**(3): 149-165.
- Wenzel, J., S. Henze, et al. (2005). "Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus." *The Journal of investigative dermatology* **124**(6): 1241-1248.
- White, G. E., T. C. Tan, et al. (2010). "Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling." *Cardiovascular research* **85**(4): 825-835.
- Willoughby, D. and D. M. Cooper (2007). "Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains." *Physiological reviews* **87**(3): 965-1010.
- Willoughby, D., M. L. Halls, et al. (2012). "A key phosphorylation site in AC8 mediates regulation of Ca²⁺-dependent cAMP dynamics by an AC8-AKAP79-PKA signalling complex." *Journal of cell science* **125**(Pt 23): 5850-5859.
- Witt, D. P. and A. D. Lander (1994). "Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations." *Curr Biol* **4**(5): 394-400.

- Wolfe, B. L. and J. Trejo (2007). "Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis." Traffic **8**(5): 462-470.
- Wong, S. K. (2003). "G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs." Neuro-Signals **12**(1): 1-12.
- Wong, W. and J. D. Scott (2004). "AKAP signalling complexes: focal points in space and time." Nature reviews. Molecular cell biology **5**(12): 959-970.
- Wu, B., E. Y. Chien, et al. (2010). "Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists." Science **330**(6007): 1066-1071.

X

- Xin, H., T. Kikuchi, et al. (2005). "Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells." European journal of immunology **35**(5): 1371-1380.

Y

- Yamada, M., A. Inanobe, et al. (1998). "G protein regulation of potassium ion channels." Pharmacol Rev **50**(4): 723-760.
- Yang, X. P., S. Mattagajasingh, et al. (2007). "Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway." Circulation research **101**(10): 1001-1008.
- Yasuda, M., T. Ito, et al. (2008). "Fractalkine and TGF-beta1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans." World journal of gastroenterology : WJG **14**(42): 6488-6495.
- Yin, Q., W. Cheng, et al. (2010). "Intrathecal injection of anti-CX3CR1 neutralizing antibody delayed and attenuated pain facilitation in rat tibial bone cancer pain model." Behavioural pharmacology **21**(7): 595-601.
- Yopp, A. C., J. Shia, et al. (2012). "CXCR4 expression predicts patient outcome and recurrence patterns after hepatic resection for colorectal liver metastases." Annals of surgical oncology **19 Suppl 3**: S339-346.
- Yue, C., K. L. Dodge, et al. (1998). "Phosphorylation of serine 1105 by protein kinase A inhibits phospholipase Cbeta3 stimulation by Galphaq." The Journal of biological chemistry **273**(29): 18023-18027.

Z

- Zaccolo, M., F. De Giorgi, et al. (2000). "A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells." Nat Cell Biol **2**(1): 25-29.
- Zaja-Milatovic, S. and A. Richmond (2008). "CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing." Histology and histopathology **23**(11): 1399-1407.
- Zernecke, A., E. A. Liehn, et al. (2006). "Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10." Blood **107**(11): 4240-4243.
- Zhang, J., Y. Ma, et al. (2001). "Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14997-15002.
- Zheng, J., M. Yang, et al. (2013). "Chemokine receptor CX3CR1 contributes to macrophage survival in tumor metastasis." Molecular cancer **12**(1): 141.
- Zhou, X., K. J. Herbst-Robinson, et al. (2012). "Visualizing dynamic activities of signaling enzymes using genetically encodable FRET-based biosensors from designs to applications." Methods in enzymology **504**: 317-340.
- Zhuang, Z. Y., Y. Kawasaki, et al. (2007). "Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine." Brain, behavior, and immunity **21**(5): 642-651.

- Zimmermann, N., J. J. Conkright, et al. (1999). "CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization." The Journal of biological chemistry **274**(18): 12611-12618.
- Zlotnik, A., A. M. Burkhardt, et al. (2011). "Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis." Nature reviews. Immunology **11**(9): 597-606.
- Zujovic, V., J. Benavides, et al. (2000). "Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation." Glia **29**(4): 305-315.
- Zujovic, V., N. Schussler, et al. (2001). "In vivo neutralization of endogenous brain fractalkine increases hippocampal TNFalpha and 8-isoprostane production induced by intracerebroventricular injection of LPS." Journal of neuroimmunology **115**(1-2): 135-143.